

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

CHEMIE V PŘÍRODNÍCH VĚDÁCH  
Studijní program: CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jan Blahut

Bifunkční chelatanty dvojmocné mědi

BIFUNCTIONAL LIGANDS FOR COPPER(II) COMPLEXATION

Vedoucí práce:  
Doc. RNDr. Jan Kotek, Ph.D.

Praha, 2011



*Talent je odvaha začínat stále znovu.*

Honegger Artur

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1. června 2011

Jan Blahut

Krom Vás, ctění čtenáři, kteří jste vyzvednuli tento svazek ze zaprášených hlubin knihovny či internetu, je potřeba vzdát hold také mnohým, bez jejichž pomoci by tato bakalářská práce nikdy nevznikla, a Vy byste jaksí neměli co vyzvedávat.

Díky patří především mým rodičům, bez nichž by nebylo nejen této práce, ale především autora samotného. Díky jim také za všemožnou hmotnou i nehmotnou podporu během studia a bezednou studnu tolerance a porozumění.

Kopec obdivu pak náleží mému skvělému školiteli doc. Janu Kotkovi, který projevil značný talent člověka posunout vždy tím správným směrem k cíli.

Stejně tak děkuji RNDr. Janu Svobodovi za ochotu práci oponovat.

Z mnohých dalších děkuji panu Mírovi za snahu naučit mě práci na mnohých přístrojích, a to i přes moji schopnost všechno velmi rychle zničit. Dále děkuji RNDr. I. Císařové za změření a vyřešení rentgenových struktur, RNDr. J. Plutnarovi za změření složitějších NMR experimentů, RNDr. Janě Havlíčkové za změření a vypočtení rovnovážných konstant, vedení katedry fyzikální a makromolekulární chemie PřF UK za možnost využít jejich vybavení a všem ostatním, kteří věnovali svůj čas na měření spekter mých látek.

Na závěr patří speciální poděkování nT, snM a snL za *velmi* dobré nápady, pravidelně aktualizovanou nástěnku a pestře dekorované pracovní prostředí.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
1.1	Motivace . . . . .	8
1.2	Cíle práce . . . . .	9
<b>I</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Kinetické vlastnosti měďnatých komplexů</b>	<b>12</b>
2.1	Crownethery . . . . .	12
2.2	Cyklické thioethery . . . . .	12
2.3	Dusíkaté ligandy . . . . .	13
2.3.1	Disociační kinetiky . . . . .	14
2.3.2	Deriváty cyklamu a cyklenu . . . . .	17
2.3.3	Přemostěné makrocykly . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Termodynamické vlastnosti měďnatých komplexů</b>	<b>20</b>
3.1	Volba vhodného srovnávacího parametru . . . . .	20
3.2	Srovnání ligandů . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Biokonjugace</b>	<b>24</b>
4.1	Magická kulka . . . . .	24
4.2	Vazebné možnosti . . . . .	24
4.3	Vektory . . . . .	26
4.3.1	Receptor-specifické vektory . . . . .	26
4.3.2	EPR efekt a jeho využití . . . . .	27

<b>II Praktická část</b>	<b>29</b>
5.1 Použité analytické metody . . . . .	30
5.2 Další informace . . . . .	31
<b>6 Syntéza ligandu</b>	<b>33</b>
6.1 Syntéza cyklamů . . . . .	33
6.2 Syntéza 1,8-chráněného cyklamů . . . . .	34
6.3 Příprava 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny . . . . .	36
6.4 Příprava cílového produktu alkylací . . . . .	37
6.4.1 Příprava alkylačních činidel . . . . .	37
6.4.2 Alkylace ethylesterovým alkylačním činidlem . . . . .	40
6.4.3 Alkylace benzylesterovým alkylačním činidlem . . . . .	41
6.5 Kabachnikova-Fieldsova reakce . . . . .	43
6.6 Redukce nitroskupiny a odchránění cyklu . . . . .	45
6.7 Příprava měďnatých komplexů ligandu <b>V</b> . . . . .	46
<b>7 Biokonjugace</b>	<b>47</b>
7.1 Syntéza NCS prekurzoru . . . . .	47
7.2 Modelová konjugace . . . . .	48
<b>8 Kinetická měření</b>	<b>51</b>
8.1 Disociace komplexu [Cu <b>V</b> ] . . . . .	51
8.1.1 Příprava komplexu . . . . .	51
8.1.2 Příprava pomocných roztoků . . . . .	52
8.1.3 Měření . . . . .	53
8.2 Formační kinetiky . . . . .	54
8.2.1 Příprava zásobních roztoků . . . . .	54
8.2.2 Závislost $k_{\text{obs}}$ na koncentraci kovu . . . . .	54
8.2.3 Závislost $k_{\text{obs}}$ na pH . . . . .	55
<b>9 Diskuze</b>	<b>56</b>
9.1 Syntéza ligandu . . . . .	56
9.1.1 Alkylační činidla . . . . .	56
9.1.2 Syntéza Fieldsovou-Kabachnikovou reakcí . . . . .	57
9.2 Struktura komplexů . . . . .	58
9.3 Biokonjugace . . . . .	59

9.4	Termodynamická data . . . . .	60
9.5	Disociační kinetiky . . . . .	62
9.5.1	Zpracování dat . . . . .	63
9.5.2	Hodnocení . . . . .	67
9.6	Formační kinetiky . . . . .	67
9.6.1	Závislost na koncentraci mědi . . . . .	67
9.6.2	Závislost na pH . . . . .	68
<b>10</b>	<b>Závěr</b>	<b>71</b>
<b>III</b>	<b>Přílohy</b>	<b>73</b>
A	Celkové syntetické schéma . . . . .	74
B	Rengenostrukturní data . . . . .	75
C	Seznam zkratek . . . . .	75

# Kapitola 1

## Úvod

### 1.1 Motivace

Vzrůstající požadavky na počet a přesnost radiologických vyšetření jsou spojeny se vzrůstajícími nároky na využívané kontrastní látky. Stejně tak léčba některých onemocnění především rakovinné a leukemické povahy si žádá využití stále sofistikovanějších léčiv na radiochemické bázi.

Značný potenciál nabízí radionuklidy mědi. Přehled využitelných nuklidů tohoto kovu je k nahlédnutí v tabulce 1.1.

**Tabulka 1.1:** Nejvýznamnější radionuklidy mědi [1]

Nuklid	$t_{1/2}$	Rozpad	$E_\gamma/\text{keV}$	$E_\beta/\text{keV}$	Zdroj
$^{60}\text{Cu}$	20 min	$\beta^+$ (93 %) EC (7 %)	511 1332	873 –	cyklotron
$^{61}\text{Cu}$	3,3 h	$\beta^+$ (62 %) EC (38 %)	511 283	527 –	cyklotron
$^{62}\text{Cu}$	9,6 min	$\beta^+$ (98 %) EC (2 %)	511 –	1315 –	generátor/cyklotron
$^{64}\text{Cu}$	13 h	$\beta^+$ (19 %) EC (41 %) $\beta^-$ (40 %)	511 1346 –	278 – 190	reaktor/cyklotron
$^{66}\text{Cu}$	5,4 min	$\beta^-$ (100 %)	–	1109	reaktor/cyklotron
$^{67}\text{Cu}$	62 h	$\beta^-$ (100 %)	93	121	reaktor/cyklotron



Výhoda ligandových systému pro měď je především v jejich univerzálnosti. Některé nuklidy mědi ( $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ) lze využít pro rychle se rozšiřující metodu PET<sup>i)</sup>, některé pro SPECT<sup>ii)</sup> ( $^{67}\text{Cu}$ ) a mnohé z nich jsou svými energetickými vlastnostmi vhodné i pro terapeutické využití [2]. Zvláštní pozornost si zasluhuje nuklid  $^{64}\text{Cu}$ , jelikož poskytuje jak terapeuticky výhodný  $\beta^-$  rozpad, tak  $\beta^+$  pro PET, a to vše společně s příznivým poločasem rozpadu 13 hodin.

Aby bylo možno zajistit správnou distribuci kovu v tkáních, musí navrhovaný ligandový systém vykazovat vysokou odolnost proti rozkladu i za nízkých koncentrací a v prostředí s různým pH, iontovou silou a také v přítomnosti nadbytku jiných potenciálních ligandů a iontů biogenních kovů ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , *etc.*). Aby bylo možné tuto odolnost zajistit, je nutno připravit ligand, jehož komplex je stálý nejen z termodynamického hlediska. V poslední době se ukazuje, že ještě důležitější pro nízké koncentrace radiofarmak je aspekt kinetický, respektive kinetická inertnost. Těmto vlastnostem nejvýznamnějších skupin měďnatých komplexů budou věnovány následující kapitoly, přičemž největší pozornost bude zaměřena na cyklické aminy, jelikož zde se vyskytují „nejslibnější adepti“ na budoucí kontrastní látky.

Aby kontrastní látka byla nejen odolnou, ale také poskytovala obraz nějaké tělní, ideálně patologické, struktury, musí ji být možné jednoduše modifikovat. Této partii je věnována kapitola Biokonjugace.

Právě tato dvojí funkce ligandu je ukryta ve slově *bifunkční* – mající koordinační místa pro kov a také aktivní skupiny vhodné k efektivním konjugacním reakcím.

## 1.2 Cíle práce

V kontextu výše uvedených požadavků na ligandový systém si tato práce klade za cíl:

<sup>i)</sup> *Positron Emission Tomography* – Pozitronová emisní tomografie

<sup>ii)</sup> *Single-Photon Emission Computed Tomography* – Jednofotonová emisní počítačová tomografie

### **V teoretické části**

- Srovnat kinetickou inertnost komplexů dvojmocné mědi s různými ligandy.
- Tyto komplexy srovnat i z hlediska termodynamické stability.
- Shrnout dostupné možnosti konjugací bifunkčních ligandů na farmakologicky významné molekuly.

### **V praktické části**

- Pomocí dostupných syntetických technik připravit bifunkční ligand pro dvojmocnou měď, navržený s ohledem na znalosti nabyté v teoretické části.
- Připravit měďnatý komplex tohoto ligandu, případně jeho izomery.
- Změřit a vyhodnotit kinetické parametry disociace tohoto komplexu v kyselém prostředí.
- Změřit a vyhodnotit rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu v podmínkách s různým pH.
- Zvolit vhodný modelový systém a demonstrovat možné bifunkční využití ligandu.

# Část I

## Teoretická část

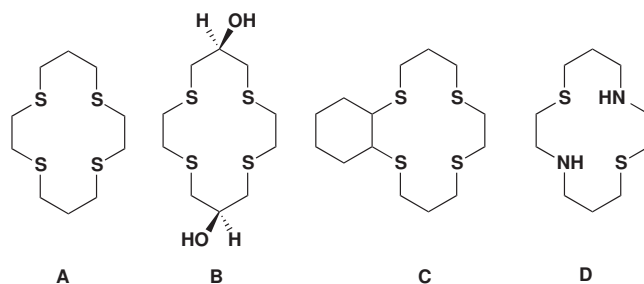
## Kapitola 2

# Kinetické vlastnosti měďnatých komplexů

### 2.1 Crownethery

Cyklické ethery (neboli *crownethery*) jsou dle Pearsonovy teorie velmi tvrdými bázemi a jejich potenciál pro koordinaci dvojmocné mědi je malý.

### 2.2 Cyklické thioethery



Obrázek 2.1: Deriváty 14členného S<sub>4</sub> cyklothioetheru

Síra ve formě thiolu je spíše jako střední až měkký donorový atom a je tedy relativně vhodná pro koordinaci Cu<sup>2+</sup>.

Ze skupiny cyklických thiolů jsou kinetické parametry nejlépe prostudované u thiolů obsahujících čtyři atomy síry. Vznik komplexů těchto ligandů

ve vodném roztoku  $\text{Cu}^{2+}$  se řídí přibližně kinetikou druhého řádu s rychlostní konstantou  $k_f$  a rychlost určujícím krokem je koordinace druhého donorového atomu ke kovu – tedy uzavření prvního chelátového kruhu.

V závislosti na počtu atomů makrocyclu od 12 do 16 roste postupně rychlostní konstanta  $k_f$  z hodnoty  $0,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  pro dvanáctičlenný kruh až po  $23,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  pro šestnáctičlenný.<sup>1)</sup> [3]

Byly též studovány různé modifikace 14členného  $\text{S}_4$  cyklothiolu. Připojení hydroxylových skupin na propylenovou část cyklu vedlo ke zřetelnému snížení  $k_f$ , v případě uvedené struktury **B** 100× oproti nederivatizovanému ligandu **A**. Relativně překvapující je, že změna ethylenové spojky za cyklohexylenovou (**C**) nezpůsobuje žádnou výraznější změnu  $k_f$ .

Výměnou jednoho či dvou atomů síry za atomy dusíku výrazně vzrůstá rychlost vzniku komplexu, a to až na hodnotu  $k_f = 2,0 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  u ligandu s dusíky v polohách 1,8, tj. sloučeniny **D**. Dle [3] není rychlost určujícím krokem koordinace s makrocyklem **D** vznik druhé koordinační vazby, ale první vazby, tj. výměna molekuly vody za molekulu ligandu.

Obecně je však tato skupina ligandů ke koordinaci mědi pro radiomedicínské účely poměrně nevhodná, jelikož ligandy a jejich komplexy nejsou příliš dobře rozpustné ve vodě, a především mohou snadno podléhat redoxním dějům, a to nejen na systému  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ , ale i na skeletu ligandu.

## 2.3 Dusíkaté ligandy

V této oblasti koordinační chemie mědi se nacházejí nejstabilnější komplexy tohoto kovu. Bylo připraveno velké množství ligandů obsahujících ke kovu se koordinující dusíkaté atomy, bohužel jen malá část z nich byla prostudována z kinetického hlediska. Z velké části proto, že se jedná o reakce velmi rychlé.

Pro radiochemické aplikace je nejdůležitější informací mechanismus a rychlosti vzniku komplexu. Pro medicínské účely je pak důležitá kinetická stálost komplexu, jež se typicky zjišťuje disociací komplexu za zvýšené teploty v kyselém prostředí silné minerální kyseliny, kdy je existence komplexů termodynamicky nevýhodná.

<sup>1)</sup>U 14členného makrocyclu byla stanovena  $k_f = 13 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$

### 2.3.1 Disociační kinetiky

Následující část bude věnována srovnání disociační kinetiky měďnatých komplexů typu  $[\text{CuL}]$  v kyselém prostředí.

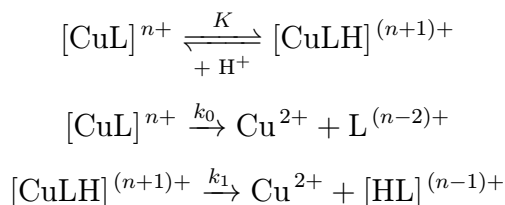
#### Kinetické modely

Závislost rychlosti disociace na parametrech reakčního prostředí byla různými autory studována různě podrobně. V některých případech byl stanoven pouze poločas reakce v určité koncentraci silné anorganické kyseliny při dané teplotě. Tento fundamentální popis bude v následujícím textu použit pro srovnání jednotlivých komplexů, jelikož všechny složitější modely lze snadno přepočítat na libovolnou hodnotu koncentrace  $[\text{H}^+]$ .

V podrobnějších studiích je pak většinou rychlost reakce  $v_d = \frac{dc_{\text{CuL}}}{dt}$  popisována kinetikou pseudoprvního řádu vůči komplexu:

$$v_d = k_{\text{obs}} c_{\text{CuL}}, \quad (2.1)$$

kde  $k_{\text{obs}}$  je parametr měnící se především v závislosti na  $[\text{H}^+]$  a  $c_{\text{CuL}}$  je totální analytická koncentrace komplexu. Nejběžnější model disociace je popsán následujícím schématem:

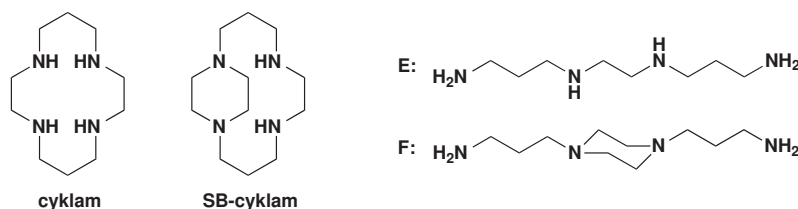


Po vyjádření  $c_{\text{CuL}} = [\text{CuL}] + [\text{CuLH}]$  a drobných úpravách získáme vztah (2.2)

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_0 + k_1 K [\text{H}^+]}{1 + K [\text{H}^+]}. \quad (2.2)$$

V tomto výrazu se v praxi často některé členy zanedbávají. Pokud komplex disociuje o mnoho řádů rychleji ve svojí protonizované formě, pak lze zanedbat člen  $k_0$ . Často také nastává situace, že při dané vysoké koncentraci kyseliny je člen  $\frac{[\text{CuLH}]}{[\text{CuL}]} = K[\text{H}^+] \gg 1$ , čili ve jmenovateli lze vůči němu jedničku zanedbat a pak  $k_{\text{obs}} = k_1$  a rychlost disociace je na  $[\text{H}^+]$  nezávislá.

## Srovnání lineárních a cyklických aminů [4]


 Obrázek 2.2: Cyklam, SB-cyklam<sup>ii)</sup> a jejich lineární analoga

Obecně je znám makrocyclický efekt jako termodynamický jev. Kinetická stabilita komplexů je ovšem také ovlivněna cyklickým uspořádáním ligandu. Dobře to lze posoudit z porovnání odolnosti vůči kyselé dekomplexaci dvojic komplexů [Cu-cyklam] vs. [Cu-**E**] a [Cu-SB-cyklam]<sup>iii)</sup> vs. [Cu-**F**].

Tabulka 2.1: Disociace měďnatých komplexů cyklamu, SB-cyklamu a jejich acyklických analog

	[Cu-cyklam] <sup>a,b</sup>	[Cu-SB-cyklam] <sup>a</sup>
$k_{\text{obs}}$	$(1,31 \pm 0,12) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	$(1,23 \pm 0,11) \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$
$\tau_{1/2}$	$22,0 \pm 2,0 \text{ dne}$	$23,5 \pm 2,1 \text{ dne}$
	[Cu- <b>E</b> ] <sup>c</sup>	[Cu- <b>F</b> ] <sup>c</sup>
$k_{\text{obs}}$	$13 \pm 2 \text{ s}^{-1}$	$0,16 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$
$\tau_{1/2}$	$75 \pm 9 \text{ ms}$	$6,2 \pm 0,7 \text{ s}$

<sup>a</sup>v 1M HClO<sub>4</sub> při 60 °C;  $I = 1 \text{ M}$

<sup>b</sup>nekonzistence s tabulkou 2.2

<sup>c</sup>přepočteno pro 1M HClO<sub>4</sub> při 25 °C;  $I = 0,5 \text{ M}$

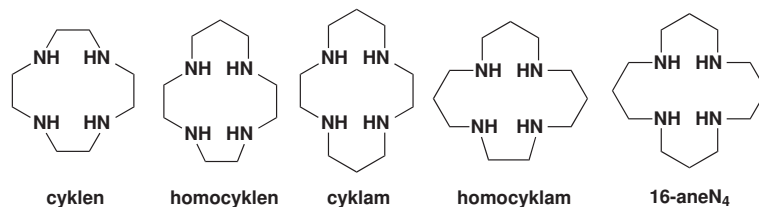
Rychlost reakce lze v dobrém přiblížení popsat pomocí  $k_{\text{obs}}$  či pomocí poločasu reakce  $\tau_{1/2}$ . Z uvedených dat v tabulce 2.1 je patrné, že komplexy cyklických ligandů jsou o mnoho řádů kineticky inertnější.

Vysokou míru kinetické lability pak vykazují komplexy s aminokarboxylovými ligandy jako EDTA a DTPA<sup>iii)</sup> [5].

<sup>ii)</sup>SB-cyklam značí *Side-Bridged*, čili bočně přemostěný cyklam

<sup>iii)</sup>EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina; DTPA – diethylentriaminpentaoctová kyselina, viz obrázek 3.2

## Velikost makrocyklu



**Obrázek 2.3:** N<sub>4</sub> makrocykly různých velikostí kruhu

Snažíme-li se mezi dusíkatými makrocykly najít vhodný ligand pro radionuklid mědi, je na místě určitou pozornost věnovat velikosti cyklu.

Pro komplexy mědi není sice velikost makrocyklu tak zásadní, jako je tomu například u crownetherů a alkalických kovů, ale přesto má významný vliv. Tento lze dobře popsat na základě hodnocení rychlosti disociace měďnatých komplexů s řadou ligandů na obrázku 2.3.

Poločasy disociace  $\tau_{1/2}$  v prostředí kyseliny dusičné o  $[H^+] = 1,0$  M, iontové síle  $I = 5,0$  M (upraveno NaNO<sub>3</sub>) a teplotě 25 °C ukazuje tabulka 2.2.

**Tabulka 2.2:** Poločas disociace komplexů s Cu<sup>2+</sup> v kyselém prostředí o koncentraci  $[H^+] = 1,0$  M, teplotě 25 °C a iontové síle  $I = 5,0$  M

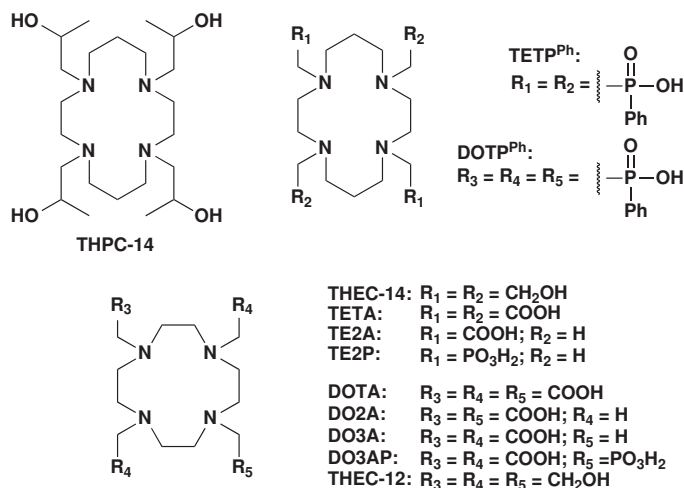
Ligand	$\tau_{1/2}/\text{min}$
Cyklen	$16 \pm 2$
Homocyklen	$14,5 \pm 0,1$
Cyklam <sup>a</sup>	202
Homocyklam	$1,63 \pm 0,7$
16-aneN <sub>4</sub>	$(3 \pm 2) \times 10^{-2}$

<sup>a</sup>Nekonzistentní data s tabulkou 2.1 – přestože takto velký rozdíl v publikovaných datech nemůže být vyvolán změnou aniontu či iontové síly, byla data v každé tabulce získána vždy stejnou metodou a jsou tedy porovnatelná.

Z popsaných dat jasně vidíme, že kineticky nejstálější měďnaté komplexy poskytuje čtrnáctičlenný cyklus (cyklam), dále pak dvanácti a třináctičlenný cyklus – cyklen a homocyklen.[6, 7]



### 2.3.2 Deriváty cyklamu a cyklenu



**Obrázek 2.4:** Nepřemostěné deriváty cyklamu a cyklenu

Nejen z důvodů uvedených v předchozí kapitole, ale také z hlediska syntetické přístupnosti jsou nejlépe prozkoumány makrocyclické ligandy odvozené od cyklamu a cyklenu.

Hodnoty reakčních poločasů kyselé hydrolýzy měďnatých komplexů s různými ligandy jsou uvedeny v tabulce 2.3 a příslušné struktury jsou uvedeny na obrázku 2.4. Je nutno podotknout, že uvedená data jsou získána z různých modelů závislosti  $k_{\text{obs}}$  na pH a také na teplotě a přepočítána tak, aby mohly být hodnoty co nejlépe srovnány. Zvláště pak hodnoty pro komplexy s TETA a TE2A byly získány velmi hrubou aproximací – Arrheniovou rovnicí – ze dvou teplotních bodů a mají tedy pouze orientační charakter. I přes tyto faktory lze z uvedených dat získat užitečné informace o chování komplexů.

Dle [8] je komplex s DO2A méně stálý než s DOTA. Protože komplex s TETA je stálější než s DOTA a s TE2A je stálější než s TETA, tak i komplex s TE2A je stálější než s DO2A. Z ligandů se dvěma pendantními rameny je tedy výhodnější soustředit se na deriváty cyklamu. Což dobře koresponduje s faktem, že komplex TE2P s kyslíky v polohách *trans* je vůbec nejstálějším komplexem z porovnávaných.

Obecně jsou tedy kineticky nejstálější deriváty cyklamu s *nižším* počtem pendantních ramen, která by měla obsahovat spíše kyselou (aniontovou) než alkoholovou (neutrální) skupinu.

**Tabulka 2.3:** Poločasy hydrolýzy  $\text{Cu}^{2+}$  komplexů derivátů makrocyclů

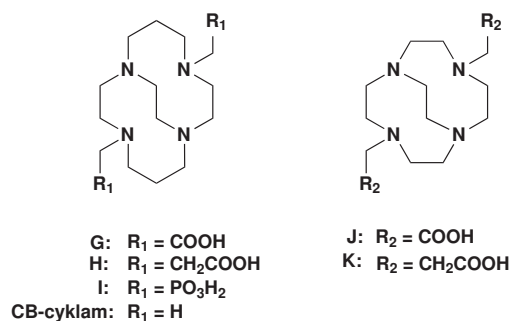
Ligand	$T/^{\circ}\text{C}$	$I/\text{M}$	$[\text{H}^+]/\text{M}$	$\tau_{1/2}$	Reference
THPC-14	25	1 $\text{ClO}_4^-$	1	0,17 s	[9]
THEC-14	25	1,5 $\text{NO}_3^-$	1	0,28 s	[10]
TETA	25 <sup>a</sup>	5 $\text{Cl}^-$	5	4 dny	[8]
TE2A	25 <sup>a</sup>	5 $\text{Cl}^-$	5	150 dnů	[8]
THEC-12	25	1,5 $\text{NO}_3^-$	1	$6,85 \pm 0,22$ h	[10]
DOTA	25	1 $\text{ClO}_4^-$	1	1,32 dnů	[11]
DO3A	25	0,5 $\text{NO}_3^-$	1	3,3 h	[12]
DO3AP	25	5 $\text{ClO}_4^-$	1	2,33 h	[11]
TE2P <sup>b</sup>	25	5 $\text{ClO}_4^-$	1	$19 \pm 3$ min	[14]
TE2P <sup>c</sup>	25	5 $\text{ClO}_4^-$	1	227 dnů	[14]
TETP <sup>Ph</sup>	25	0,429 $\text{ClO}_4^-$	1	26,2 s	[10]
DOTP <sup>Ph</sup>	25	5 $\text{ClO}_4^-$	1	5,41 min	[10]

<sup>a</sup>Extrapolováno z hodnot pro 90 a 50  $^{\circ}\text{C}$  Arrheniovou rovnicí  $k(T) = Qe^{\frac{-E}{RT}}$

<sup>b</sup>*pc* – *penta-coordinated* – komplex ve tvaru deformované čtyřboké pyramidy s kyslíkovým atomem ve vrcholu

<sup>c</sup>*trans-O, O* – tvar deformovaného oktaedru s kyslíky v polohách *trans*

### 2.3.3 Přemostěné makrocyclky



**Obrázek 2.5:** Deriváty přemostěných makrocyclů

V posledním desetiletí byla značná pozornost věnována derivátům makrocyclů s kryptandovou strukturou, jež lze odvodit spojením diagonálních dusíků ethylenovým můstkem, tzv. *cross-bridged* makrocyclů. Příklady takovýchto ligandů jsou uvedeny na obrázku 2.5.

Komplexy všech těchto ligandů vykazují vysokou odolnost vůči kyselé disociaci i za velmi drastických podmínek [15, 16]. V tabulce 2.4 lze stabilitu posoudit podle disociačních poločasů v prostředí 5M HCl při 90 °C.

Zcela evidentně jsou deriváty cyklenu mnohem méně stálé než jejich cyklamová analoga.

Bohužel tyto ligandy mají v radiomedicíně omezené využití, jelikož jejich komplexy vznikají pomalu a navíc za podmínek, které jsou pro mnohé biologické struktury navázané na ligandu zcela destruktivní. Tím pádem je nelze jednoduše použít jako bifunkční ligandy.

**Tabulka 2.4:** Poločasy hydrolýzy  $\text{Cu}^{2+}$  komplexů přemostěných derivátů makrocyclů při 90 °C v prostředí 5M HCl

Ligand	$\tau_{1/2}$
<b>G</b>	154 h
<b>H</b>	$\approx 100$ h <sup>a</sup>
<b>I</b>	3,8 h
<b>J</b>	<3 min <sup>b</sup>
<b>K</b>	<3 min <sup>c</sup>
CB-cyklam	11,8 min

<sup>a</sup>hodnota pouze odhadnuta v důsledku rozložení ligandového skeletu za těchto podmínek; ve 12M HCl při 90 °C  $\tau_{1/2} = 40$  min

<sup>b</sup>v 1M HCl při 30 °C  $\tau_{1/2} = 37,3$  min

<sup>c</sup>v 1M HCl při 30 °C  $\tau_{1/2} = 11,8$  min

## Kapitola 3

# Termodynamické vlastnosti mědňatých komplexů

### 3.1 Volba vhodného srovnávacího parametru

Jak bylo řečeno v úvodu, zabývat se kinetickou inertností komplexů má smysl teprve za podmínek, kdy se systém nachází v nerovnovážném stavu. Z toho důvodu má zásadní význam věnovat pozornost také systému termodynamických rovnováh v roztocích komplexů o různém pH. Základními veličinami popisujícími tyto rovnováhy jsou rovnovážné konstanty. Tyto lze nadefinovat jako konsektivní, jak ukazuje příklad konsektivní rovnovážné konstanty  $K_{211}$  protonizace ligandu již jednou protonizovaného komplexu ligandu L s kovem M ve výrazu (3.1)<sup>i)</sup>:

$$K_{211} = \frac{[\text{H}_2\text{LM}]}{[\text{HLM}][\text{H}]}, \quad (3.1)$$

kde [v závorkách] jsou relativní rovnovážné koncentrace částice v roztoku.

Další možností je zavedení celkových konstant stability  $\beta_{hlm}$  částice  $[\text{H}_h\text{L}_l\text{M}_m]$  dle rovnice (3.2):

$$\beta_{hlm} = \frac{[\text{H}_h\text{L}_l\text{M}_m]}{[\text{H}]^h[\text{L}]^l[\text{M}]^m}. \quad (3.2)$$

---

<sup>i)</sup>Nepovede-li to k nedorozumění, budou v rovnicích v následujícím textu náboje z důvodu přehlednosti vynechány.

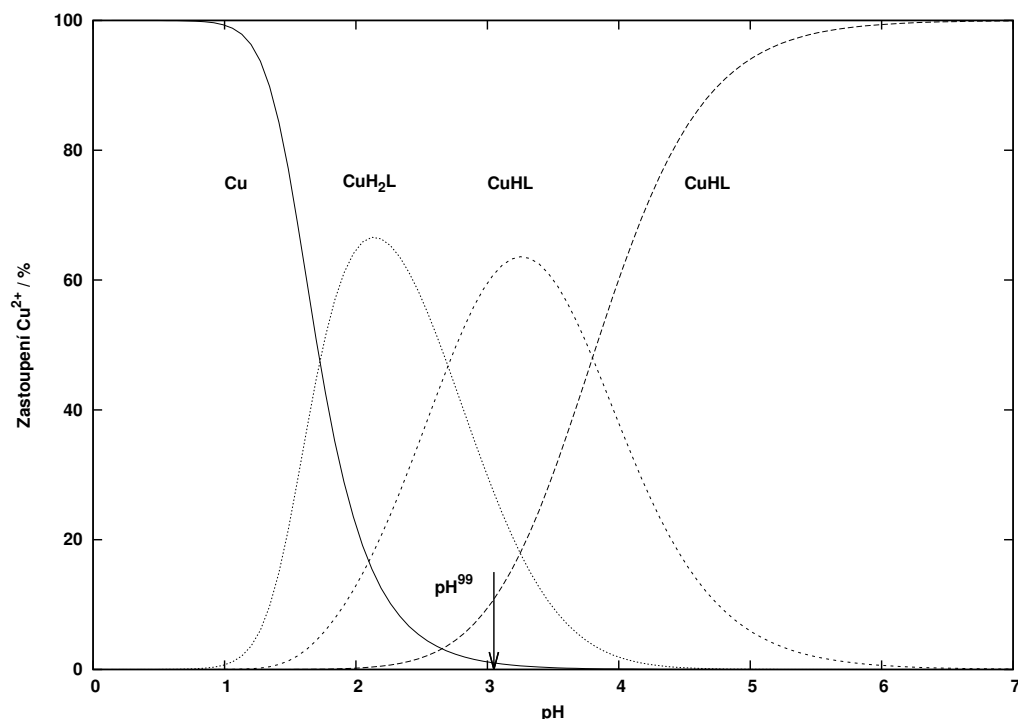
Pro vznik stejné částice jako v příkladě k rovnici (3.1) by celková konstanta stability měla tvar:

$$\beta_{211} = \frac{[\text{H}_2\text{LM}]}{[\text{H}]^2[\text{L}][\text{M}]} \quad (3.3)$$

Jednoduše lze dokázat, že celkovou konstantu stability některé částice lze získat součinem všech odpovídajících konsektivních konstant. Například celková konstanta stability výše uvedeného komplexu  $[\text{H}_2\text{LM}]$  je dána součinem:

$$\beta_{211} = K_{011} \cdot K_{111} \cdot K_{211}.$$

V prvním přiblížení by mohly popsané rovnice vyvolat dojem, že jediným důležitým parametrem je konstanta stability popisující stabilitu komplexu  $\beta_{011}$  a vzhledem k její přibližně lineární korelaci s bazicitou ligandů [17] bude největší stabilitu v kyselém prostředí vykazovat nejbazičtější ligand. Tento pohled je ale chybný, jelikož u silně bazických ligandů konkuruje vazbě kov–ligand vazba proton–ligand a v celkovém složení roztoku se pak výrazně projevují i protonizační konstanty ligandů.

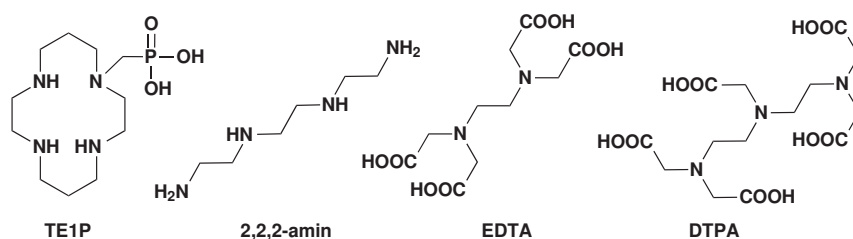


Obrázek 3.1: Distribuční diagram systému  $\text{Cu}^{2+}$  – TETA

Nejllepší představu o složení roztoku lze získat z distribučních diagramů – především z těch, které zobrazují distribuci různých forem komplexů kovu v závislosti na pH. Příklad tohoto diagramu pro komplexy  $\text{Cu}^{2+}$  s ligandem TETA je na obrázku 3.1.

Chceme-li charakterizovat afinitu kovu k ligandu v závislosti na pH nějakým jednoduše porovnatelným číslem, je velmi vhodnou volbou hodnota pH, při které je v komplexu vázáno dané procento kovu, např. 99 % kovu. Tuto hodnotu pH pak označíme  $\text{pH}^{99}$  a lze pomocí ní dobře srovnat různorodé ligandové systémy. Hodnota  $\text{pH}^{99}$  je ale závislá na koncentraci kovu a ligandu. Ve *všech* dále uvedených výpočtech a distribučních diagramech bylo počítáno s  $c_{\text{Cu}} = c_{\text{L}} = 4 \text{ mM}$ .

## 3.2 Srovnání ligandů



**Obrázek 3.2:** Doposud neuvedené ligandy pro srovnání termodynamických vlastností

Tabulka 3.1 srovnává  $\text{pH}^{99}$  pro komplexy  $\text{Cu}^{2+}$  s některými ligandy, především s ligandy zmíněnými v kapitole o disociačních kinetikách. Doposud nepopsané ligandy jsou uvedeny na obrázku 3.2. Data pro TE2A bohužel nejsou dostupná, jelikož za podmínek měření protonizačních konstant dochází k uzavírání laktamového kruhu.

Shrneme-li termodynamická data<sup>ii)</sup> pro různé ligandy, lze konstatovat, že v nejkyseljším prostředí jsou stále komplexy makrocyclických ligandů bez

<sup>ii)</sup> Uvedené reference byly zdrojem primárních dat, tedy  $\beta_{hlm}$ , z nichž byly modelové distribuční diagramy vypočteny programem Opium. [18]

pendantních ramen a to především třinácti, dvanácti a čtrnáctičlenných tetra-azacyklů. Šestnáctičlenný cyklus je již příliš velký a tím pádem nevhodný.

**Tabulka 3.1:**  $\text{pH}^{99}$  pro vybrané komplexy mědi při teplotě  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , iontové síle  $I = 0,1\text{ M}$  a analytických koncentracích kovu a ligandu  $c_{\text{Cu}} = c_{\text{L}} = 4\text{ mM}$

Ligand	$\text{pH}^{99a}$	Ligand	$\text{pH}^{99}$
<b>Lineární aminy</b>		<b>Deriváty cyklamů</b>	
2,2,2-amin	3,88	TE1P	2,42 <sup>c</sup>
3,2,3-amin	4,74	CB-TE2A = <b>G</b>	2,79 <sup>d</sup>
<b>Cyklické aminy</b>		TETA	3,06
homocyklen	0,35	TE2P	3,69 <sup>e</sup>
cyklam	1,08	THEC-14	3,81
cyklen	1,26	THPC-12	4,06
SB-cyclam	1,46 <sup>b</sup>	TETP <sup>Ph</sup>	4,50 <sup>e</sup>
homocyklam	3,60	<b>Deriváty cyklenu</b>	
16-aneN4	4,27	DO3AP	2,45 <sup>c</sup>
<b>Deriváty lineárních aminů</b>		DO3A	2,49
EDTA	1,54	DOTP <sup>Ph</sup>	2,55 <sup>f</sup>
DTPA	1,69	DOTA	2,63

<sup>a</sup>Není-li uvedeno jinak je zdrojem dat databáze [19]

<sup>b</sup>Reference: [22]

<sup>c</sup>Reference: [20]

<sup>d</sup>Reference: [21]

<sup>e</sup>Reference: [11]

<sup>f</sup>Reference: [10]

Zavádíme-li na dusíkaté atomy cyklu funkční skupiny, měly by být i v tomto případě voleny kyselé (tj. v komplexu záporně nabitě skupiny), jelikož snižují stabilitu méně než alkoholové skupiny. Necyklické ligandy obecně komplexují měď až při vyšším pH, což platí nejen pro aminy, ale také pro hojně využívané ligandy EDTA a DTPA.

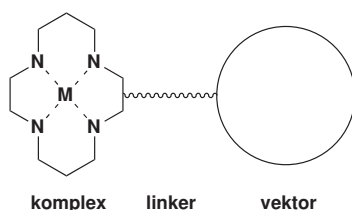
# Kapitola 4

## Biokonjugace

### 4.1 Magická kulka

Významným cílem celé farmakologie je příprava léčiva, které by fungovalo jako tzv. magická kulka (*magic bullet*) – tedy po vpravení do těla by léčivo či diagnostická látka putovala cíleně pouze na určené místo a neinteragovala s žádnou další tělní strukturou.

Aby se mohly látky založené na bifunkčních ligandech přiblížit tomuto ideálu, je potřeba na ligand připojit přes vhodnou spojku (*linker*) některý z v těle aktivních *vektorů*, jak orientačně ukazuje obrázek 4.1.

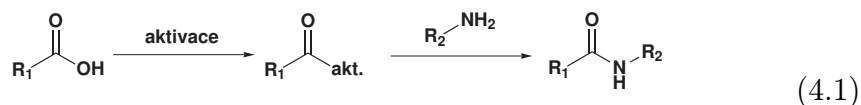


Obrázek 4.1: Systém komplex-linker-vektor

### 4.2 Vazebné možnosti

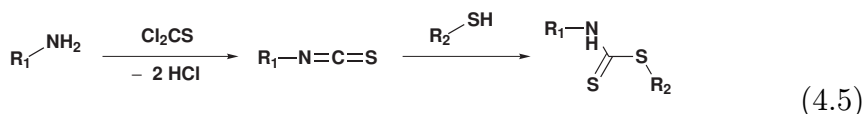
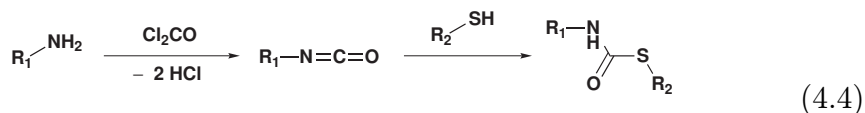
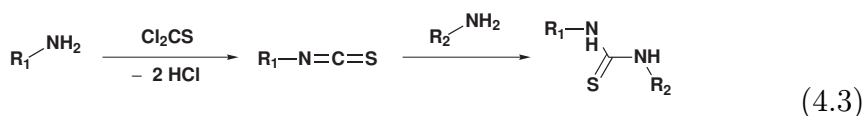
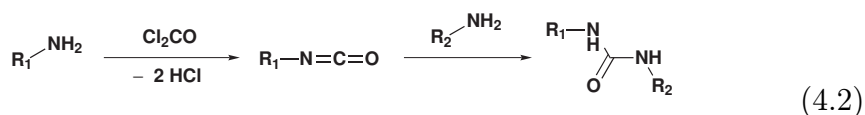
Hlavními požadavky na spojení ligandu s vektorem je stabilita spojení a také rychlý a selektivní způsob vzniku. Nejčastěji jsou využívány vazby amidické – rovnice (4.1).





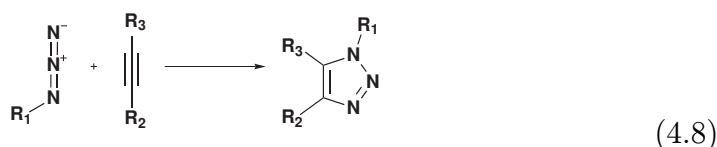
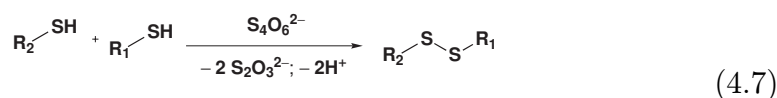
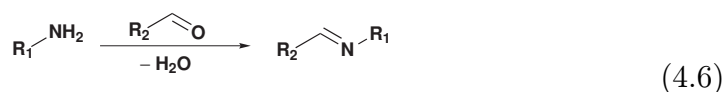
Postupů pro jejich získání s různými substráty je velké množství. Skupina „akt.“ symbolizuje skupinu aktivující kyselinu<sup>i)</sup>, jelikož neaktivovaná kyselina reaguje za vzniku amidu až za velmi tvrdých podmínek často vedoucích k rozkladu některého z reaktantů.[23, 24]

Další možností je spojení pomocí močoviny či thiomočoviny za využití reakce aminu s fosgenem (respektive thiofosgenem) a následné spojení isokyanátové (respektive isothiokyanátové) skupiny s aminem – rovnice (4.2) (resp. (4.3)). Isokyanátová i isothiokyanátová skupina může reagovat také s thiolem, jak ukazují rovnice (4.4) a (4.5).[25]



V některých případech lze také využít vznik stálé schiffovské báze (4.6) či disulfidových skupin (například reakcí dvou thiolových skupin v přítomnosti tetrathionanu sodného v rovnici (4.7)). Další možností je využití reakce azidů s trojnou vazbou – tj. *click* reakce, jak ukazuje rovnice (4.8). Tyto reakce jsou většinou katalyzované měďnými ionty.[25, 26]

<sup>i)</sup>Například *N,N'*-dicyklohexylisomočovinou skupinu při použití *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu, aktivní anhydrid, aktivní ester *etc.*



Přímé připojení vektoru na komplex může ovlivnit biologické vlastnosti systému. Tento problém je řešen linkerem. Vhodnou volbou jeho velikosti a složení lze také ovlivnit některé další vlastnosti léčiva, například hydrofobicitu.

Nejčastěji používaným linkerem je zřejmě polyethylenglykol (PEG), či homopeptidy jako polylysin, polyglycin a polyaspartát *etc.*[27] V některých případech lze také využít kratší spojky, jako hydrazin či ethylendiamin.

## 4.3 Vektory

Používané vektory lze rozdělit do dvou základních, částečně se překrývajících skupin – receptor-specifické vektory a vektory využívající EPR efektu.

### 4.3.1 Receptor-specifické vektory

Do této skupiny řadíme především látky proteinové povahy, jako jsou monoklonální protilátky a menší peptidy, často hormonální povahy. Dále pak menší molekuly, jako např. kyselinu listovou nebo oligosacharidy.

V poslední době [27] jsou cílem výzkumu spíše menší molekuly než velké monoklonální protilátky, a to především díky jejich lepší syntetické dostupnosti, nižší ceně a snazšímu vylučování z těla. Nejčastěji využívanými peptidy jsou hormony somatostatin, bombesin a především jejich analoga se zvýšenou odolností vůči hydrolytickým degradačním procesům.

Velmi zajímavý je také systém biotin-avidin – nejznámější případ *pre-targetingové* strategie použití vektoru.

### Biotin-avidin

Avidin je protein schopný s velmi vysokou afinitou vázat 4 molekuly biotinu. Je-li avidin označen vektorem, například protilátkou, naváže se v těle na cílovou strukturu. Zbylý avidin se z krevního řečiště odstraní například polymerem obsahujícím pevně vázané biotiny. Tímto procesem se výrazně zlepší poměr avidinu v cílové tkáni vůči avidinu v krvi. Nakonec je do těla vpraven biotin s komplexem radionuklidu kovu, který se rychle naváže na biotin a může být detegován. Největší výhodou tohoto přístupu je fakt, že vázání systému vektor-avidin na tělní receptor může probíhat i několik dní a není omezeno poločasem rozpadu radionuklidu.[26]

### 4.3.2 EPR efekt a jeho využití

Jak prokázali již v 90. letech Matsumura a Maeda [28], některé vysokomolekulární látky s relativní molekulovou hmotností mezi 40 000 a 70 000 vykazují zvýšenou akumulaci v rakovinných tkáních s vyvinutým systémem prokrvení<sup>ii)</sup> oproti látkám nízkomolekulárním. Tento jev je pozorovatelný u mnoha polymerních látek, micel a jiných částic lipidického charakteru. Je nazýván EPR-efekt (*Enhanced Permeability and Retention effect*).

Zvýšená produkce látek vyvolávajících růst cév a jejich propustnost (jako například *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF či oxid dusnatý) společně se zvýšenými nároky na prokrvení rychle rostoucí rakovinné tkáně způsobují vznik patologických struktur v cévním systému nádoru. Významné je především zvýšené množství cév se slabou vrstvou hladkého svalstva tvořících nepravidelnou síť s velkým množstvím otvorů. Tok krve v tomto systému je nepravidelný, často s vyšším tlakem. Zároveň se v nádorech prakticky nevyvíjí lymfatická tkáň, která by ve zdravé tkáni odváděla z mezibuněčného prostoru většinu vysokomolekulárních látek.

<sup>ii)</sup>Tedy u většiny, kromě hypovaskulárních nádorů, jako jsou například rakovina prostaty nebo slinivky břišní.

Díky těmto vlivům lze u některých látek (viz níže) pozorovat EPR-efekt již 10 minut po intravenózním podání – poměr koncentrací v krvi/nádoru je  $1/5$  až  $1/30$ . Po cca 6 h pak vzroste poměr koncentrace v rakovinné/zdravé tkáni  $30\text{--}300\times$ .

Ještě lepších výsledků je možno dosáhnout umělým zvýšením krevního tlaku pacienta, jelikož dobře vyvinuté řečiště ve zdravých tkáních reguluje průtok krve, což nedokonalá síť cév v nádoru nedokáže a zvýšením průtoku krve se zvýší akumulace EPR-aktivních látek až  $3\times$ . [28]

Nejčastěji jsou jako EPR nosiče použity syntetické polymery, různé typy micel, lipozomů a nanočástic. Další výhodou je fakt, že na strukturu nosiče mohou být připojeny ještě další molekuly zlepšující distribuci, nebo umožňujících sledování distribuce látky pomocí diagnostických metod (SPECT, PET, MRI, luminiscence *etc.*).

### **Značení lipozomů**

Ke značení lipozomů lze přistupovat třemi základními cestami. Zaprvé lze vhodný ve vodě rozpustný ligand umístit do vnitřního vodného prostředí lipozomu, zadruhé lze komplex s lipofilním ligandem inkorporovat do lipidové dvojvrstvy ohraničující lipozom a nakonec je také možné ligand zakotvit na povrchu lipozomu pomocí delšího alifatického řetězce. Do vnitřní části lipozomů či micel může být také umístěno léčivo a jeho distribuce po organismu pak může být dobře radiologicky sledována.

# Část II

## Praktická část

## 5.1 Použité analytické metody

### Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Spektra nukleární magnetické rezonance jader  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  byla měřena na spektrometrech Varian<sup>UNITY</sup> INOVA 400, VNMRS300 a Bruker AVANCE-III 600 MHz vybaveném kryosondou, na němž byly zároveň měřeny více-dimenzionální experimenty. Rezonanční frekvence měřených jader jsou uvedeny v MHz, chemické posuny  $\delta$  v ppm a interakční konstanty  $J$  v Hz. Jako reference ve spektrech  $^1\text{H}$  byl použit vnitřní standard – tetramethylsilan (TMS) ( $\delta = 0,00$  ppm) nebo  $t$ -BuOH ( $\delta = 1,25$  ppm) podle použitého rozpouštědla, popřípadě bylo referencováno na zbytkové nedeuterované rozpouštědlo. Ve spektrech  $^{13}\text{C}$  bylo jako reference využito vnitřního standardu TMS ( $\delta = 0,0$  ppm) nebo  $t$ -BuOH ( $\delta = 30,3$  ppm) podle rozpouštědla, nebo jádro uhlíku v  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,0$  ppm). Spektra  $^{31}\text{P}$  byla referencována na vnější standard  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\delta = 0,0$  ppm).

### Hmotnostní spektra (MS)

K získání hmotnostních spekter aniontů a kationtů byl využívám hmotnostní spektrometr Bruker ESQUIRE 3000, ionizující pomocí elektrospereje se separací a detekcí v iontové pasti. Uvedené hodnoty  $m/z$  byly získány s přesností  $\pm 0,2$ .

### Elementární analýza

Obsah uhlíku, dusíku, vodíku a chloru byl stanoven na automatickém analyzátoru Perkin Elmer 2400, jímž disponuje Ústav makromolekulární chemie AVČR v. v. i. Data jsou uváděna v hmotnostních procentech.

### Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Pro tenkovrstvou chromatografii bylo použito především destiček *Silufol*<sup>®</sup> firmy Kavalier se silikagelovou stacionární fází fixovanou pomocí škrobu na hliníkové destičky, dále destičky firmy Merck se silikagelovou stacionární fází *Silica gel 60F<sub>254</sub>* obsahující UV-luminofor a lepenou sádrou na hliníkové destičky.

K detekci byl využíván 0,5% ethanolový roztok ninhydrinu, nasycený roztok chloridu měďnatého ve vodě, páry  $I_2$ , zhášení luminiscence Merck TLC destiček zobrazované pomocí 254nm UV-lampy a luminiscence některých látek při excitaci 366nm UV-lampou. Využité mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých charakterizací. Složení směsí je uvedeno v objemových dílech.

### **Rentgenostrukturní analýza**

Měření bylo provedeno na difraktometru NODIUS KAPPA CCD se zdrojem  $Mo-K\alpha$ , vyřešení pomocí programu SIR92, vypřesnění pomocí programu SHELXL97. Obrázky vyřešených struktur jsou uvedeny v diskuzi. Teplotní elipsoidy jsou vykresleny pro 50% pravděpodobnost výskytu. Krystalografická data k jednotlivým strukturám jsou uvedena v příloze B. Obrázky molekulových struktur jsou uvedeny v diskuzi.

### **Spektrofotometrická měření**

Měření rychlostí kyselé hydrolýzy bylo prováděno na UV/VIS spektrofotometru Biochrom *Lightwave II* s teplotou regulovanou Peltierovým článkem v rozmezí  $30-70 \pm 0,2$  °C.

Měření formačních kinetik byla prováděna na UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2401PC taktéž s Peltierovým článkem při teplotě  $25 \pm 0,05$  °C.

### **Infračervená spektroskopie**

Infračervená spektra byla získána metodou DRIFT v matrici KBr na FTIR spektroskopu Nicolet 6700 s rozlišením  $4\text{ cm}^{-1}$  a vlnočtovým rozsahem do 400 do  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

## **5.2 Další informace**

Veškeré použité chemikálie a prekursorby byly minimálně čistoty p.a. Kvalita bezvodých rozpouštědel byla buďto garantována dodavatelem, nebo byla tato rozpouštědla sušena standardními způsoby dle literatury. [31]

Rotační vakuová odparka (RVO) byla používána k odstranění rozpouštědel. Používané teploty lázně byly přibližně o 20 °C nižší než jsou teploty varu

daných rozpouštědel při atmosférickém tlaku – dle objemů rozpouštědel a kvality vakua zajišťovaného membránovou vývěvou.

Výtěžky reakcí jsou uvedeny v procentech teoretického výtěžku reakce. Je nutné upozornit na to, že další frakce produktů byly z matečných louhů v mnoha případech získány až po jejich nashromáždění vícenásobným opakováním reakcí, a proto byl reálný výtěžek často vyšší než uvedený.

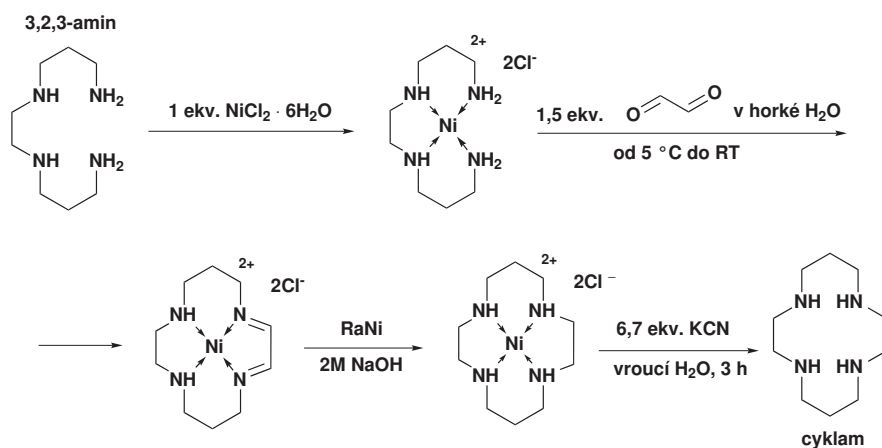
Není-li uvedeno jinak, je reakční teplotou míněna teplota použité olejové nebo jiné lázně.



# Kapitola 6

## Syntéza ligandu

### 6.1 Syntéza cyklamu



Obrázek 6.1: Syntéza cyklamu

Syntéza hlavního prekursoru – cyklamu – byla provedena několikakrokovou templátovou syntézou z 1,5,8,12-tetraazadodekanu (tj. 3,2,3-aminu) na  $\text{Ni}^{2+}$  kationtu.

*Upozornění:* Při této syntéze se pracuje s prudce jedovatým kyanidem draselným, je proto potřeba věnovat zvýšenou pozornost udržení bazického pH roztoků v odpovídajících krocích a veškeré odpady obsahující KCN nejprve detoxifikovat zředěným peroxidem vodíku. Další nebezpečí skýtá Raneyův nikl, který je v suché formě pyroforický, a je proto třeba zamezit jeho úplnému vysušení při filtraci.

Ve 2l baňce bylo v 500 ml vody rozpuštěno 20,0 g 3,2,3-aminu a za stálého míchání bylo přidáno 27,3 g (1 ekv.) hexahydrátu chloridu nikelnatého. Vzniklý roztok byl v ledové lázni ochlazen na 5 °C.

V další baňce bylo ve 120 ml vody suspendováno 12 g (0,5 ekv.) *trimeru* glyoxalhydrátu a suspenze byla zahřívána až do jejího úplného rozpuštění. Tento horký roztok byl přikapán k roztoku nikelnatého komplexu, jehož teplota byla udržována stále na 5 °C. Poté byla reakční směs ponechána cca 12 h při laboratorní teplotě k úplnému dokončení reakce.

Ke vzniklému fialovému roztoku bylo přidáno 500 ml cca 2M roztoku NaOH. Poté bylo po malých částech za intenzivního míchání přidáno 25 g Raneyova niklu a směs byla ponechána k doreagování přes noc. Raneyův nikl byl poté odfiltrován na *velké* fritě S2 pokryté kaší vzniklou z kousků rozcupovaného filtračního papíru ve vodě. K filtrátu bylo dále opatrně přisypáno 25 g (6,7 ekv.) KCN a roztok byl zahříván k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 h.

Po ochlazení byl roztok rozdělen na dvě poloviny a každá z nich byla extrahována 5 × 100 ml chloroformu. Celých 1 000 ml chloroformové fáze bylo spojeno, vysušeno bezvodým síranem sodným, přefiltrováno a odpařeno na RVO na takový objem, aby právě započala krystalizace produktu. Zahuštěná směs byla dovysrážena velkým nadbytkem (cca 4× objem suspenze) acetonitrilu. Produkt byl odsát na fritě, promyt acetonitrilem, prosát vzduchem a dosušen v evakuovaném exsikátoru nad NaOH.

Bylo získáno 17 g produktu, což odpovídá výtěžku 73 %.

Vzhledem k návodu dobře odzkoušenému během pokročilých praktik z anorganické chemie byl produkt charakterizován pouze pomocí TLC:

**TLC:** *i*-PrOH : NH<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O = 6 : 1 : 8; *R<sub>f</sub>* = 0,3 – srovnáno se standardem.

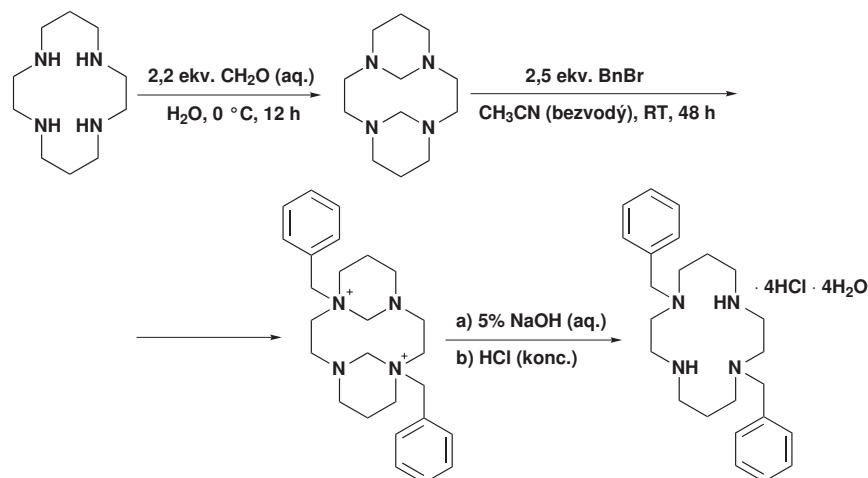
## 6.2 Syntéza 1,8-chráněného cyklamu

Pro chránění cyklamu v polohách 1,8 byly zvoleny benzylové skupiny. Syntézu 1,8-dibenzylcyklamu naznačuje schéma na obrázku 6.2.

V 600 ml dest. vody bylo rozpuštěno 10,0 g cyklamu. Tento roztok byl ochlazen na 0 °C.<sup>i)</sup> Poté bylo přidáno 9,0 ml 35% roztoku formaldehydu (2,2 ekv.).

---

<sup>i)</sup>použitá chladicí lázeň NaCl, led a H<sub>2</sub>O (cca 1 : 5 : 5)



**Obrázek 6.2:** Syntéza 1,8-dibenzylcyclamu ( $\text{Bn}_2\text{CAM}$ )

Reakční směs byla ponechána přes noc k pozvolnému ohřátí na laboratorní teplotu. Vzniklá bílá sraženina byla odfiltrována na fritě S3, matečný louh byl zahuštěn na RVO. Poté byl odfiltrován další díl sraženiny. Produkt byl dehydratován při 120 °C v baňce opatřené sušící rourkou.

Výtěžek: 9,1 g ~ 81 %. Vzhledem k dobrým zkušenostem s tímto postupem nebylo potřeba provádět charakterizaci tohoto meziproductu.[32]

Získaný bisaminal cyclamu s methylenovými můstky byl rozpuštěn ve 120 ml suchého acetonitrilu a bylo k němu přidáno 17 g benzylbromidu (2,5 ekv.). Reakce probíhala 2 dny při laboratorní teplotě. Sraženina kvarterní soli byla odfiltrována na fritě S3 a suspendována ve 400 ml 5% NaOH. Dibenzylcyclam byl izolován extrakcí této suspenze 8×100 ml  $\text{CHCl}_3$ . Chloroformový roztok byl odpařen na RVO dosucha a triturován HCl (konc.). Produkt byl, ve formě tetrahydrochloridu tetrahydrátu, izolován filtrací na fritě S3, poté promyt acetonem a dosušen prosátím vzduchem.

Výtěžek: 17,5 g ~ 72 %.

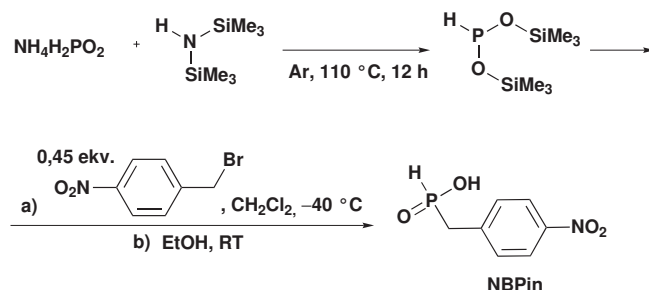
*Charakterizace:*

**TLC:** EtOH :  $\text{NH}_3$  = 20 : 1;  $R_f$  = 0,3

**MS:** +381  $[\text{M} + \text{H}]^+$

**$^1\text{H-NMR}$**  (volný amin): (299,94 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,81 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 2,48–2,72 (m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$  cyklu); 3,69 (s,  $\text{NCH}_2\text{Ph}$ ); 7,20–7,29 (m, arom.)

## 6.3 Příprava 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny



**Obrázek 6.3:** Syntéza 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny (NBPIn)

Dalším prekurzorem v syntéze cílového ligandu je 4-nitrobenzylfosfinová kyselina (NBPIn). Schématicky je její příprava popsána na obrázku 6.3. Jedná se o dvojkrokovou syntézu, avšak z důvodu vysoké citlivosti k oxidaci není meziprodukt izolován.

Do trojhrdlé baňky s míchadlem bylo naváženo 20,0 g fosforanu amonného, k baňce byl připojen chladič a baňka byla pečlivě vysekurována opakovanou evakuací a naplněním argonem. Poté byla baňka opatřena bublačkou, gumovým septem a proud argonu byl upraven na cca 3 bubliny za 5 sekund. Injekční stříkačkou bylo do baňky vpraveno 100 ml (2 ekv.) hexamethyldisilazanu a reakční směs byla zahřívána v olejové lázni na 100–110 °C po dobu 12 h.<sup>ii)</sup> Poté byla reakční směs vyjmuta z lázně a ochlazena na teplotu přibližně –40 °C<sup>iii)</sup>. Při této teplotě byl k reakční směsi přidán pomocí injekční stříkačky roztok 23,6 g (0,45 ekv.) nitrobenzylbromidu ve 200 ml bezvodého CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Je nutné dbát na to, aby se do baňky nedostal vzdušný kyslík, a to ani v podobě bublin v injekční stříkačce.

V dalším kroku byla reakční směs ponechána k pozvolnému ohřátí na laboratorní teplotu. Po 12 hodinách míchání v mírném proudu argonu byl proud argonu zesílen a veškerá reakční směs byla kvantitativně převedena pomocí kanyly do baňky obsahující 500 ml EtOH. Veškerý alkoholový roztok byl odpařen dosucha na RVO a rozpuštěn ve vroucí vodě (cca 10–20 ml na 1 g odparku tj. 300 ml). Nerozpustné nečistoty byly za horka odděleny filtrací na fritě S3. Po ochlazení filtrátu se vyloučila NBPIn jako žluté krystaly.

<sup>ii)</sup>teplota nesmí přesáhnout bod varu hexamethyldisilazanu, tj. 120 °C

<sup>iii)</sup>chladičí lázeň – suchý led/EtOH

NBPIn pak byla oddělena filtrací přes fritu S3, promyta studenou  $\text{H}_2\text{O}$ , prosáta vzduchem a dosušena v exsikátoru nad  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

Bylo připraveno 15,8 g 4-nitrobenzylfosfinové kyseliny, což odpovídá výtěžku 64 % vzhledem k nitrobenzylbromidu.

*Charakterizace:*

Vzhledem k dobrým zkušenostem s uvedeným postupem syntézy byl produkt charakterizován pouze  $^1\text{H}$ -NMR a  $^{31}\text{P}$ -NMR.

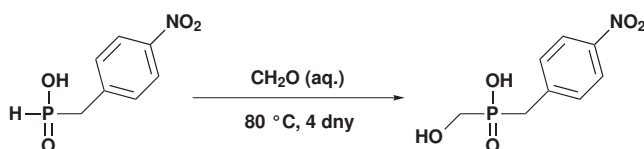
$^{31}\text{P}$ -NMR: (121,42 MHz; 1M NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ ): 27,76 (d, 1P,  $^1J_{\text{PH}} = 523$ )

$^1\text{H}$ -NMR: (299,94 MHz; 1M NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,13 (d, 2H,  $\text{ArCH}_2\text{P}$ ,  $^2J_{\text{HP}} = 17,70$ ); 6,98 (d, 1H,  $\text{PH}$ ,  $^1J_{\text{PH}} = 523$ ); 7,44 (d, 2H, arom.,  $^2J_{\text{HH}} = 8,70$ ); 8,19 (d, 2H, arom.,  $^2J_{\text{HH}} = 8,70$ )

## 6.4 Příprava cílového produktu alkylací

Prvním způsobem navrženým pro syntézu klíčových intermediátů **I** a **II** (viz obrázek 6.7 či přílohu A) byla alkylace dibenzylcyclamu pomocí esterů nitrobenzylhydroxymethylfosfinové kyseliny (NBHMPin) aktivované na hydroxymethylu mesylovou skupinou<sup>iv)</sup>.

### 6.4.1 Příprava alkylačních činidel



**Obrázek 6.4:** Příprava nitrobenzyl-hydroxymethylfosfinové kyseliny (NBHMPin)

Reakční odpad z Kabachnikových-Fieldsových reakcí, obsahující převážně nitrobenzylfosfinovou kyselinu (NBPIn) a také nitrobenzyl-hydroxymethylfosfinovou kyselinu (NBHMPin), byl překrystalizován z vroucí vody a následně byl ve vodném prostředí při 80 °C (4 dny) převeden pomocí

<sup>iv)</sup>mesyl (Mes) – zbytek od methylsulfonové kyseliny

přibližně 10 ekv. vodného formaldehydu na nitrobenzyl-hydroxymethyl-fosfinovou kyselinu, obrázek 6.4.

Produkt byl rozpuštěn v bazické vodě a vysrážen úpravou pH na 3 pomocí koncentrované HCl. Následně byla krystalická látka od matečných louhů oddělena filtrací na fritě, promyta vodou, prosáta vzduchem a dosušena v exsíkátoru nad NaOH. Čistota byla ověřena pomocí NMR v 1M NaOD.

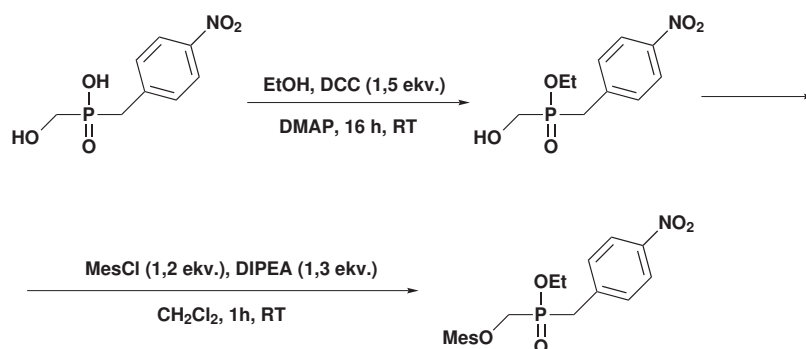
Bylo získáno 7,26 g produktu ve formě žlutohnědých krystalů.

*Charakterizace:*

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR: (161,91 MHz; 1M NaOD v  $\text{D}_2\text{O}$ ): 36,0 (s)

$^1\text{H}$ -NMR: (299,94 MHz; 1M NaOD v  $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,00 (d,  $\text{PCH}_2\text{Ar}$ ,  $^2J_{\text{PH}} = 16,20$ ); 3,41 (d, 2H,  $\text{PCH}_2\text{OH}$ ,  $^2J_{\text{PH}} = 5,40$ ); 7,26 (d, 2H, arom.,  $^3J_{\text{HH}} = 8,70$ ); 7,94 (d, 2H, arom.,  $^3J_{\text{HH}} = 8,38$ )

### Příprava mesylátu NBHMPin<sup>OE</sup>



**Obrázek 6.5:** Příprava „ethylesterového“ alkylačního činidla

Veškerá dle předchozí kapitoly připravená NBHMPin, tedy 7,26 g, byla suspendována ve 200 ml suchého EtOH a bylo přidáno 9,73 g (1,5 ekv.) DCC a katalytické množství (na špičku špachtle) DMAP, viz reakční schéma na obrázku 6.5.<sup>v)</sup> Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 16 h a její průběh byl sledován  $^{31}\text{P}$ -NMR. Nezreagovaný DCC byl přidavkem 20 ml vody (mícháno 1 h při laboratorní teplotě) převeden na *N,N*-dicyklohexylmočovinu (DCU), která byla následně odstraněna filtrací přes fritu S3. Další zbytková DCU byla odstraněna po několikadenním stání ve vodném EtOH filtrací na

<sup>v)</sup>DCC – *N,N*-dicyklohexylkarbodiimid; DMAP – *N,N*-dimethyl-4-aminopyridin

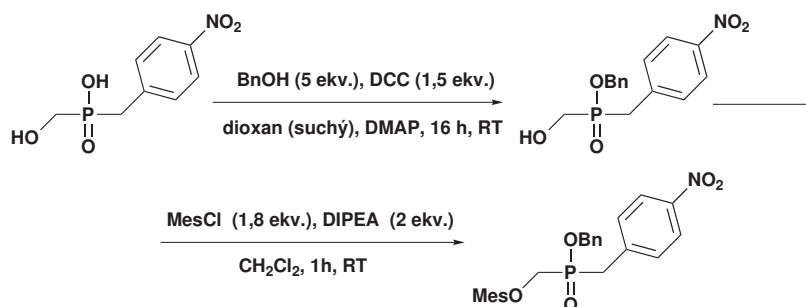
téže fritě. Poté byl filtrát odpařen na RVO, rozpuštěn v bezvodém EtOH, odpařen, rozpuštěn v  $\text{CHCl}_3$ , znovu odpařen a rozpuštěn do 200 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Do roztoku bylo přidáno 5,27 g (1,3 ekv.) DIPEA<sup>vi)</sup> a za chlazení ve vodní lázni bylo přidáno 4,34 g (1,2 ekv.) mesylchloridu. Probíhající reakce byla sledována pomocí  $^{31}\text{P}$ -NMR a po 1 h byly vedlejší produkty a nezreagované reaktanty odděleny extrakcí. Nejprve  $3 \times 100$  ml  $\text{NaHCO}_3$  (aq. nasycený), dále  $2 \times 100$  ml 5% kyseliny citronové,  $1 \times 100$  ml  $\text{NaHCO}_3$  (aq. nasycený) a nakonec  $1 \times 100$  ml 10% NaCl. Dichlormethanová fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, odpařena na RVO a odparek byl triturován v EtOH. Látka krystalizuje pravděpodobně jako monosolvát s EtOH (určeno na základě intenzit signálů v  $^1\text{H}$ -NMR).

*Charakterizace:*

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR: (121,4 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 39,2 (s)

$^1\text{H}$ -NMR: (299,94 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ): 1,17–1,30 (m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  a  $\text{H}_3\text{CCH}_2$ ); 3,08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_2$ ); 3,36 (d, 2H,  $\text{PCH}_2\text{Ar}$ ,  $^2J_{\text{HP}} = 17,69$ ); 3,83 (q, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6,88$ ); 4,10 (m, 2H,  $\text{PCH}_2\text{OMes}$ ); 4,32 (m, 2H,  $\text{POCH}_2\text{CH}_3$ ); 7,47 (q, 2H, arom,  $^3J_{\text{HH}} = 8,97$ ,  $^4J_{\text{HH}} = 2,32$ ); 8,17 (d, 2H, arom.,  $^3J_{\text{HH}} = 8,10$ )

### Příprava mesylátu NBHMPin<sup>OBn</sup>



**Obrázek 6.6:** Příprava „benzylesterového“ alkylačního činidla

Ve 20 ml suchého dioxanu bylo rozpuštěno 2,9 g NBHMPin, 5,5 g (2 ekv.) DCC, katalytické množství (cca 90 mg) DMAP a nakonec bylo přidáno 7,3 g (5 ekv.) benzylalkoholu. Reakce probíhala za laboratorní teploty 1 den. Průběh reakce byl sledován TLC a přibližně také dle množství vyloučené DCU.

<sup>vi)</sup> *N,N*-diisopropylethylamin

Poté byla reakce ukončena přidáním nadbytku vodného EtOH a vzniklá DCU byla odfiltrována na fritě. Od zbytků reakčních komponent a vedlejších produktů byl produkt oddělen sloupcovou chromatografií na SiO<sub>2</sub> za využití směsi EtOAc, CHCl<sub>3</sub> a EtOH jako mobilní fáze (postupná změna polaritý od EtOAc : CHCl<sub>3</sub> = 1 : 5 do EtOAc : EtOH = 1 : 2).

Bylo získáno 2,2 g produktu ve formě oleje, který později začal krystalizovat. To odpovídá výtěžku 55 %.

*Charakterizace:*

**TLC:** EtOAc : CHCl<sub>3</sub> = 1 : 1,  $R_f$  = 0,3

**<sup>31</sup>P-NMR:** (121,41 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 45,92 (s)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (299,94 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 3,35 (d, 2H, PCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>2</sup> $J_{PH}$  = 16,50); 3,75 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>OMes); 5,01 (d, 2H, POCH<sub>2</sub>Ph, <sup>3</sup> $J_{PH}$  = 9,90); 7,26–7,40 (m, 6H, arom.); 8,11 (d, 2H, arom., <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 9,30)

Ze vzniklých krystalů byl vybrán také krystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu.

Veškerý produkt NBHMPin<sup>OBn</sup> byl rozpuštěn ve 150 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bylo přidáno 1,8 g (2 ekv.) DIPEA; 1,4 g (1,8 ekv.) MesCl a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 1 den. Následně byla dichlormethanová fáze pročištěna extrakcemi (vždy 150 ml vodné fáze) – 3 × NaHCO<sub>3</sub> (aq. nasycený); 1 × 5% citronovou kyselinou; 1 × NaHCO<sub>3</sub> (aq. nasycený) a 1 × 10% NaCl (aq.). Dichlormethanová fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO.

Bylo získáno 2,3 g produktu ve formě hnědého prášku, což odpovídá výtěžku 76 %.

*Charakterizace:*

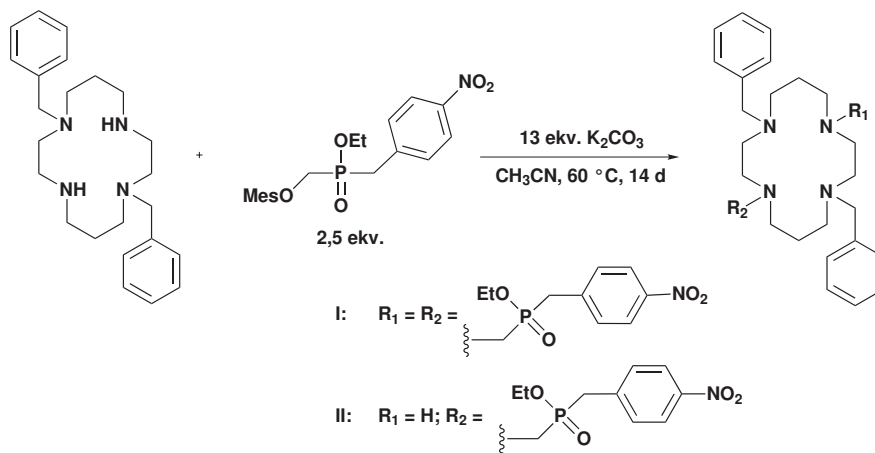
**<sup>31</sup>P-NMR:** (161,9 MHz; D<sub>2</sub>O): 40,5 (s)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (399,95 MHz; D<sub>2</sub>O): 3,00 (s, 3H, H<sub>3</sub>CS); 3,39 (d, 2H, PCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>2</sup> $J_{PH}$  = 16,40); 4,24 (m, 2H, PCH<sub>2</sub>OMes); 5,07 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>Ph); 7,34 (m, 5H, Ph); 7,44 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 11,20); 8,15 (d, 2H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 8,80)

## 6.4.2 Alkylace ethylesterovým alkylačním činidlem

Z 5% vodného roztoku NaOH do chloroformu byl extahován volný dibenzylcyklam z 1,0 g tetrahydrochloridu tetrahydrátu. Po odpaření chloroformové fáze byl odparek rozpuštěn v 30 ml acetonitrilu a bylo přidáno 1,4 g (2,5 ekv.) ethylesterové formy alkylačního činidla (viz výše) a 1,9 g (8 ekv.) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,





**Obrázek 6.7:** Alkylace ethylesterovou formou alkylačního činidla

viz obrázek 6.7. Směs byla zahřívána na 60 °C 14 dní a během této doby bylo přidáno dalších 0,3 g (cca 0,5 ekv.) alkylačního činidla a 1,2 g (5 ekv.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Byla získána směs, která dle TLC, MS a  $^{31}\text{P}$ -NMR obsahovala více než 75 % látky **I**.<sup>vii)</sup> S cílem ochránit ethylovou skupinu na fosfinové kyselině byla provedena série hydrolyz ve směsích  $\text{NH}_3$  v EtOH, LiOH ve vodném EtOH a v 1 : 1 HCl :  $\text{H}_2\text{O}$ . V bazických podmínkách nedochází ani za zvýšené teploty (50 °C) ke změně v  $^{31}\text{P}$ -NMR spektru. V prostředí HCl lze po několika dnech pozorovat úplný rozklad látky **I** za uvolnění ethylesteru NBHMPin<sup>OEt</sup> ve formě krystalů (identifikováno  $^1\text{H}$ -NMR).

### 6.4.3 Alkylace benzylesterovým alkylačním činidlem

Za různých podmínek byla testována alkylation dibenzylcyclamu<sup>viii)</sup> (25 mg) pomocí 50 mg (2 ekv.) mesylátu benzylesteru nitrobenzyl-hydroxymethyl-fosfinové kyseliny (MesNBHMPin<sup>OBn</sup>; viz výše). Jako rozpouštědlo byl zvolen DMF, acetonitril či pyridin (vždy 1 ml). Zároveň byly použity různé báze –  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$  a pyridin – první dvě v množství 2 ekv. a pyridin jako roz-

<sup>vii)</sup> Změnou poměrů reaktantů lze reakci řídit i směrem k většímu nadbytku látky **II** a oba produkty od sebe lze, i když komplikovaně, oddělit sloupcovou chromatografií na  $\text{SiO}_2$  se směsí  $\text{NH}_3$  a EtOH jako mobilní fází. Pro účely dalších reakcí však v tomto případě postačuje reakční směs.

<sup>viii)</sup> ve formě volného aminu izolovaného z tetrahydrochloridu tetrahydrátu extrakcí z 5% NaOH do chloroformu

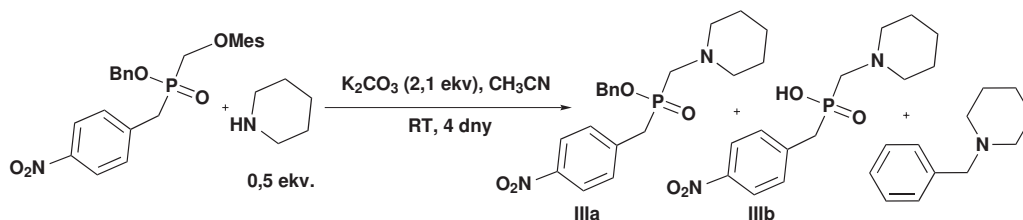
pouštědlo ve velkém nadbytu. Výsledky těchto experimentů byly zjišťovány především pomocí MS.

Po dvou dnech míchání za laboratorní teploty se v některých reakčních směsích (především v pyridinu a v acetonitrilu s  $\text{Et}_3\text{N}$ ) začal objevovat jednu alkylovaný dibenzylcyklam. Mimo to vznikly také vícekrát benzylované cyklamy. Po zvýšení teploty na  $50\text{ }^\circ\text{C}$  a dvou dnech zahřívání bylo množství vícekrát benzylovaných cyklů ještě vyšší. Zároveň se ani v jedné reakční směsi neobjevil výraznější signál dvakrát alkylovaného dibenzylcyklamu.

Tezi, že by benzylester alkylačního činidla mohl sloužit zároveň jako benzylovační činidlo, se podařilo prokázat na modelovém systému dusíkatých makrocyclů – piperidinu:

Ve stejných kombinacích rozpouštědel a bází jako v předchozím odstavci a za stejných podmínek (tedy nejprve 2 dny při laboratorní teplotě a poté 2 dny při teplotě  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ) byla provedena reakce 13  $\mu\text{l}$  piperidinu s 50 mg (1 ekv.) alkylačního činidla. MS signál *N*-benzylpiperidinu hovořil ve prospěch výše uvedené teze.

K jejímu jednoznačnému důkazu byla provedena reakce na obrázku 6.8.



Obrázek 6.8: Alkylace piperidinu

Piperidin (0,26 ml) reagoval s 0,5 g (0,5 ekv.)  $\text{MesNBHMPin}^{\text{OBn}}$  v 10 ml acetonitrilu s 0,72 g (2,1 ekv.)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Po 4 dnech míchání při laboratorní teplotě byla s reakční směsí provedena sloupcová chromatografie na  $\text{SiO}_2$  se směsí  $\text{EtOH}$  a  $\text{NH}_3$  jako mobilní fází.

*Charakterizace:*

*N*-benzylpiperidin:

**TLC:**  $\text{EtOH} : \text{NH}_3 = 35 : 1$ ;  $R_f = 0,7$

**MS:**  $+176\text{ }[\text{M} + \text{H}]^+$

<sup>1</sup>H-NMR: (299,94 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1,43 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 1,57 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,37 (t, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4,80); 3,47 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Ph); 7,23–7,31 (m, 5H, arom.)

**IIIa:**

**TLC:** EtOH : NH<sub>3</sub> = 35 : 1; *R*<sub>f</sub> = 0,9

**MS:** +389 [M + H]<sup>+</sup>; +411 [M + Na]<sup>+</sup>; −308 [M − C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>]<sup>−</sup>

**IIIb:**

**TLC:** EtOH : NH<sub>3</sub> = 35 : 1; *R*<sub>f</sub> = 0,5

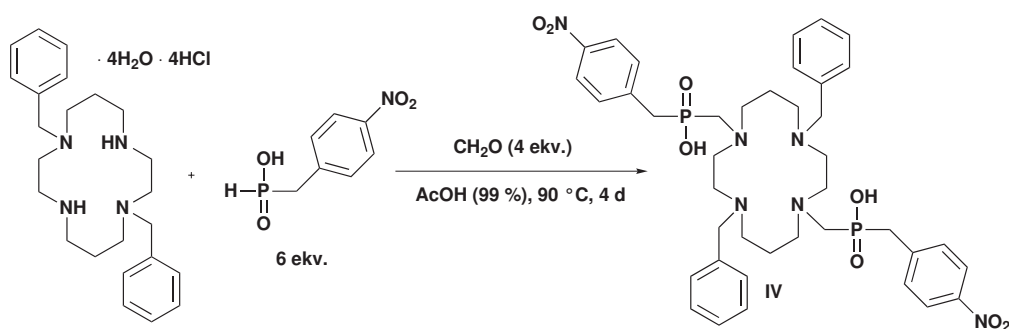
**MS:** +321 [M + Na]<sup>+</sup>; −297 [M − H]<sup>−</sup>

<sup>31</sup>P-NMR: (121,42 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 27,76 (s)

<sup>1</sup>H-NMR: (299,94 MHz; CDCl<sub>3</sub>): 1,35 + 1,55 (m, CH<sub>2</sub>); 2,45 (d, NCH<sub>2</sub>P, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 7,50); 2,60 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 3,10 (d, PCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 17,70); 7,47 (d, arom., <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,90); 8,02 (d, arom., <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,20)

Krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu byly získány volným odparem mobilní fáze.

## 6.5 Kabachnikova-Fieldsova reakce



**Obrázek 6.9:** Syntéza Kabachnikovou-Fieldsovou reakcí

Východiskem pro syntézu látky **IV** se ukázala modifikace Mannichovy reakce, kde je místo C-kyseliny použita fosfinová kyselina, respektive P–H vazba. Z několika vyzkoušených postupů se jako nejlepší ukázal postup uvedený na obrázku 6.9.

V prostředí 50 ml 99% kyseliny octové bylo smícháno 1,5 g dibenzylcyklamu (ve formě tetrahydrochloridu tetrahydrátu), 3,0 g (6 ekv.) NBPIn a 600 mg (4 ekv.) paraformaldehydu. Reakční směs byla míchána 4 dny při teplotě 90 °C a úbytek výchozího aminu byl sledován pomocí TLC. Následně byla reakční směs odpařena jednou dosucha na RVO, poté dispergována ve 100 ml destilované vody a znovu odpařena, čímž byla odstraněna zbylá kyselina octová. K odparku bylo přidáno 100 ml vody a pomocí 5% NaOH bylo zvyšováno pH až do okamžiku, kdy se suspenze rozpustila (pH 8). Produkt byl poté vysrážen jako jemná suspenze přidávkem několika peciček pevného NaOH (pH 14 dle pH papírku), odfiltrován na fritě S3, ostře prosát chladnou vodou a dosušen v exsikátoru nad  $P_2O_5$ .

*Pozn.:* Alternativně lze produkt čistit krystalizací ochlazením z horkého 5% NaOH. Tento postup ale neposkytuje tak čistý produkt jako výše uvedené srážení a proto je ho většinou nutné několikrát opakovat.

Bylo získáno 2,5 g produktu. Výtěžek je obtížně určitelný s ohledem na nestechiometrický obsah inertních nečistot – patrně chloridu či uhličitanu sodného z krystalizace. Uvažujeme-li obsah nečistot 14 % pak výtěžek odpovídá 98 %.

*Charakterizace:*

**Elementární analýza:** C = 44,81 %; H = 5,52 %; N = 7,40 % (teoreticky: C = 44,77 %; H = 5,54 %; N = 7,83 %; neč. = 13,60 % – disodná sůl látky **IV** se 4,5 H<sub>2</sub>O)

**MS:** +807 [M + H]<sup>+</sup>; −805 [M − H]<sup>−</sup>

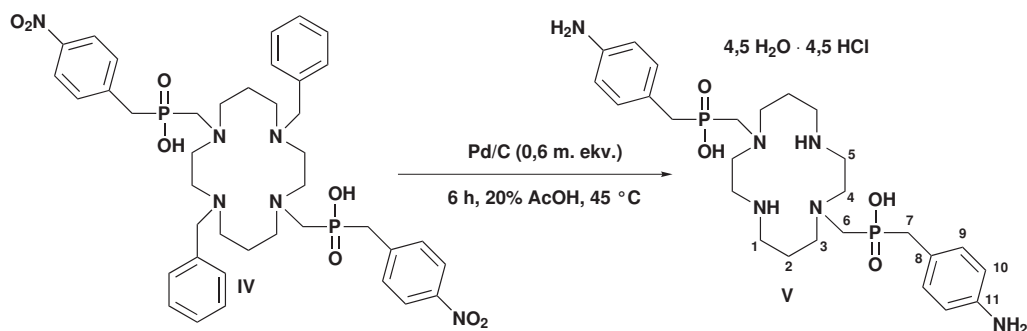
<sup>31</sup>P-NMR: (121,42 MHz; MeOH-d<sup>4</sup>): 31,3 (s)

<sup>1</sup>H-NMR: (299,94 MHz; MeOH-d<sup>4</sup>): 1,61 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,32 (d, PCH<sub>2</sub>N, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 10,17); 1,41–2,75 (4× s, 16H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3,00 (d, 4H, PCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 16,20); 3,53 (s, 4H, NCH<sub>2</sub>Ph); 7,13–7,36 (m, 14H, arom.); 7,95 (d, 4H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,10)

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR: (150,92 MHz; MeOH-d<sup>4</sup>): 23,58 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 39,00 (d, PCH<sub>2</sub>N, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 81,50); 50,94 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N cyklu); 52,69 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N cyklu); 54,00 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N cyklu); 56,36 (d, PCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 81,50); 60,65 (s, NCH<sub>2</sub>Ph); 124,07 (s, arom.); 129,32 (s, arom.); 130,47 (s, arom.); 132,04 (s, arom.); 140,10 (s, arom. kv.); 146,26 (s, arom. kv.); 147,43 (s, arom. kv.).

Volným odpařováním nasyceného methanolového roztoku byly připraveny krystaly látky **IV**·8 MeOH vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.

## 6.6 Redukce nitroskupiny a odchránění cyklu



Obrázek 6.10: Redukce látky IV na látku V

Z látky **IV** lze ligand **V** získat redukcí vodíkem na palladiovém katalyzátoru, kterou se zároveň odstraní chránící benzylové skupiny cyklu a zredukuje nitroskupina na aminoskupinu, jak je ukázáno na obrázku 6.10.

V hruškovité baňce s velkým míchadlem byl ve 120 ml 20% kyseliny octové v ochranném proudu argonu smíchán 1,0 g látky **IV** a 600 mg (0,6 hm. ekv.) 10% Pd/C. Při teplotě 45 °C byla reakční směs míchána 6 hodin. Průběh reakce byl sledován především MS a TLC.

*Upozornění:* při experimentech s *delším* reakčním časem (řádově dny) produkt v přítomnosti katalyzátoru *degraduje*.

Po proběhnutí reakce byla reakční směs přefiltrována gravitačně přes papírový filtr a oddělený katalyzátor byl propláchnut vodou. Filtrát byl odpařen na RVO a poté rozpuštěn v minimálním množství vody (cca 2 ml). K roztoku byla přidána koncentrovaná kyselina chlorovodíková a produkt byl vysrážen ve formě jemného bílého prášku převrstvením tetrahydrofuranem. Po dozrání (přes noc) byla sraženina oddělena filtrací na jemné fritě S4, promyta THF a dosušena prosátím vzduchem. Pro účely titrací a charakterizace byla procedura krystalizace ještě jednou opakována. Dle elementární analýzy se jedná o tetra až pentahydrát, tetra až pentahydrochlorid.

Bylo připraveno 0,41 g produktu, což odpovídá (při uvažované  $M_r = 821$ ) výtěžku 56 %.

Rozpuštěním ve vodě, odpařením, rozpuštěním v konc. HBr a dalším odpařením byla látka převedena z hydrochloridu na hydrobromid. V této formě

byl volnou difúzí THF do vodného roztoku okyseleného HBr získán krystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu.

*Charakterizace*<sup>ix)</sup>:

**Elementární analýza:** C = 38,77 %; H = 7,21 %; N = 11,15 %; Cl = 19,26 % (teoreticky: C = 37,63 %; H = 7,23 %; N = 10,13 %; Cl = 19,23 % látka **V**)

**MS:** −565 [MP − H]<sup>−</sup>; +567 [MP + H]<sup>+</sup>

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR: (243 MHz; D<sub>2</sub>O): 41,43 (s)

<sup>1</sup>H-NMR: (600,00 Mz; D<sub>2</sub>O): 1,89 (m, 4H,  $\mathcal{H}^2$ ); 2,90 (m, 4H,  $\mathcal{H}^3$ ); 2,94 (d, 4H,  $\mathcal{H}^6$ ,  $^2J_{\text{PH}} = 4,1$ ); 2,96 (s, 4H,  $\mathcal{H}^4$ ); 3,09 (m, 4H,  $\mathcal{H}^5$ ) 3,13 (m, 4H,  $\mathcal{H}^1$ ); 3,27 (d, 4H,  $\mathcal{H}^7$ ,  $^2J_{\text{PH}} = 16,3$ ); 7,42 (m, 4H,  $\mathcal{H}^{10}$ ); 7,46 (m, 4H,  $\mathcal{H}^9$ )

<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR: (151 MHz; D<sub>2</sub>O): 23,83 (s,  $\mathcal{C}^2$ ); 36,76 (s,  $\mathcal{C}^7$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 81,6$ ); 44,88 (s,  $\mathcal{C}^5$ ); 46,51 (s,  $\mathcal{C}^1$ ); 51,59 (d,  $\mathcal{C}^6$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 107,9$ ); 52,90 (d,  $\mathcal{C}^4$ ,  $J = 6,6$ ); 57,02 (s,  $\mathcal{C}^3$ ); 124,03 (d,  $\mathcal{C}^{10}$ ,  $J = 3,3$ ); 129,15 (d,  $\mathcal{C}^{11}$ ,  $J = 2,2$ ); 131,94 (d,  $\mathcal{C}^9$ ,  $J = 4,9$ ); 134,29 (d,  $\mathcal{C}^8$ ,  $J = 8,0$ )

## 6.7 Příprava měďnatých komplexů ligandu **V**

S ohledem na zkušenosti s ligandy podobné struktury jako ligand **V** byly připraveny dva izomery jeho měďnatého komplexu. Příprava méně stálého *pc*-[Cu**V**] je uvedena v úvodu kapitoly 8.

Isomer *trans-Q,Q*-[Cu**V**] se podařilo připravit rozpuštěním 25 mg ligandu **V** ( $\cdot 5 \text{H}_2\text{O} \cdot 4,5 \text{HCl}$ ) a 5 mg (1 ekv.) dihydrátu chloridu měďnatého v 1 ml vody. Roztok byl následně zahříván na 70 °C 2 dny v otevřené vialce. Během zahřívání byl 2× přidán 1 ml vody kompenzující odpar. Zahuštěný roztok byl následně vyčištěn chromatograficky na malé kolonce SiO<sub>2</sub>, z níž byl fialový *trans-Q,Q* izomer vyeluován směsí EtOH : NH<sub>3</sub> = 5 : 1. Fialové frakce byly zahuštěny na RVO a vykrytalizovány ze směsi ethanolu a vody pomalou difúzí THF přes plynou fázi.

---

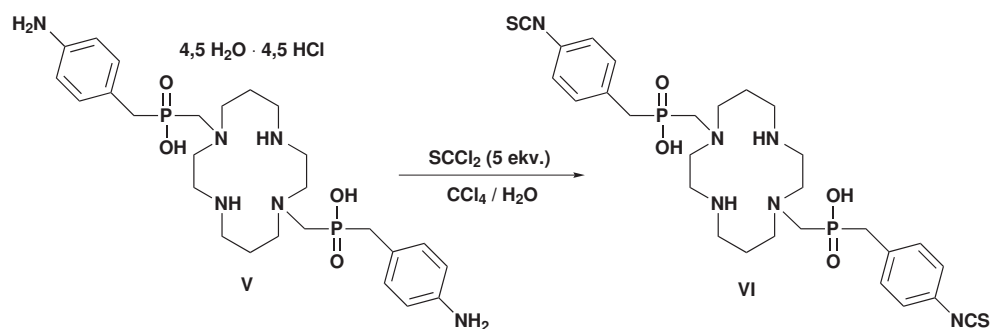
<sup>ix)</sup>Označení uhlíků a k nim se vážajících vodíků na obrázku 6.10.

# Kapitola 7

## Biokonjugace

Aromatický amin aminobenzylfosfinové skupiny látky **V** má dobré předpoklady pro „isothiokyanátový kaplink“ s různými alifatickými aminy. Jako model konjugace na sacharidové struktury byla zvolen glukosamin čili 2-deoxy-2-amino-D-glukosa.

### 7.1 Syntéza NCS prekurzoru



**Obrázek 7.1:** Syntéza prekurzoru pro isothiokyanátový kaplink s látkou **V**

Ve 4 ml vody bylo rozpuštěno 180 mg látky **V** (pH elektrodou bylo zkontrolována hodnota pH < 1). Roztok byl poté podvrstven 4 ml tetrachlormethanu a bylo přidáno (v *dobře* táhnoucí digestoři) 90  $\mu$ l (cca 5 ekv.) thiofosgeny. Za stálého míchání byla reakční směs při laboratorní teplotě ponechána přes noc k doreagování. Tetrachlormethanová fáze byla druhý den odsáta injekční

stříkačkou a vodná fáze s pevnými částicemi produktu byla odpařena na RVO dosucha a k dalšímu použití byla uchovávána v lednici.

*Pozor:* Thiofosgen je jedovatá a *velmi* zapáchající látka. Proto je s ní nutno pracovat obezřetně a veškeré zbytky ihned likvidovat roztokem čpavku v lihu. Bylo získáno 150 mg produktu.

*Charakterizace:*

**TLC:** *i*-PrOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 6 : 1 : 5;  $R_f = 0,4$

**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR:** (121,4 MHz; DMSO-*d*<sup>6</sup>): 44,0 (bs)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (299,94 MHz; DMSO-*d*<sup>6</sup>): 1,90 (s, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2,99–3,32 (m,  $\mathcal{H}_{\text{alif.}}$ ); 7,36 (s, 8H,  $\mathcal{H}_{\text{arom.}}$ )

**<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR:** (151 MHz; DMSO-*d*<sup>6</sup>): 22,8 (bs, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 36,0 (d, PCH<sub>2</sub>Ph,  $^1J_{\text{HH}} = 82$ ); 42,5 a 43,6 (2× bs, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); 49,53 (bs, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 22,8 (bs, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 50,6 (d, PCH<sub>2</sub>N,  $^1J_{\text{PC}} = 102$ ); 54,0 (bs, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 125,1 (bs, arom.); 128,2 (d, arom. kv.,  $J = 3$ ); 131,4 (d, arom.,  $J = 5$ ); 132,6 (d, arom. kv.,  $J = 9$ ); 133,3 (s, NCS)

**IR:** výrazný pás s maximem 2116 cm<sup>-1</sup>

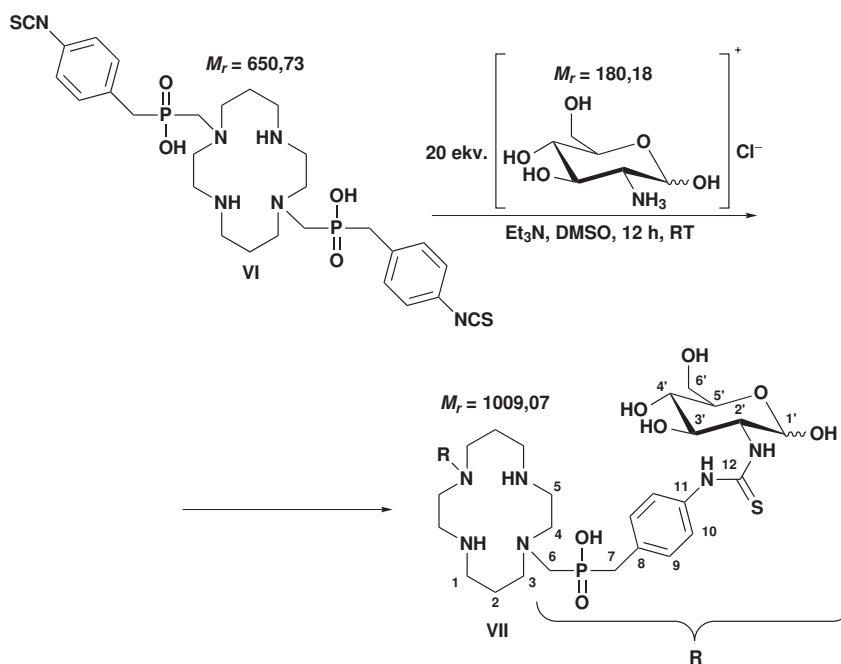
**MS:** +651 [M + H]<sup>+</sup>; +673 [M + Na]<sup>+</sup>; +689 [M + K]<sup>+</sup>; -649 [M - H]<sup>-</sup>

## 7.2 Modelová konjugace

Modelovou molekulou pro isothiokyanátový kaplink byl zvolen D-glukosamin. Schéma reakce je uvedeno na obrázku 7.2. V 1 ml DMSO bylo rozpuštěno 100 mg prekursoru **VI** získaného dle postupu v předchozí kapitole. Tento roztok byl pomalu přidán do vialky obsahující 700 mg (20 ekv.) hydrochloridu D-glukosaminu dispergovaného v 0,5 ml triethylaminu. Reakční směs byla ponechána k doreagování přes noc. Druhý den byl vzniklý hnědý roztok naředěn na 50 ml vodou a přenesena do ultrafiltrační cely s membránou o velikosti pórů 500 Da. V cele byla směs zahuštěna na 10 ml, následně naředěna znovu na 50 ml a celý postup byl opakován 4× k důslednému odstranění netěkavých rozpouštědel a zbytků glukosaminu.

Po posledním zahuštění byla směs nanесena na silikagelovou kolonu a byla provedena sloupcová chromatografie mobilní fází isopropanol, kyselina octová, voda v poměru 6 : 1 : 8. Nejprve byly eluovány hnědé produkty rozkladu glukosaminu a poté cílový produkt **VII**.





**Obrázek 7.2:** Isothiokyanátový kaplink látky **VI** s glukosaminem

Frakce obsahující produkt byly slity, odpařeny do sucha na RVO, rozpuštěny ve vodě, znovu opařeny, rozpuštěny v 50 ml vody a po zmrazení kapalným dusíkem byly lyofilizovány 3 dny při vakuu olejové vývěvy.

Celkem bylo získáno 38 mg produktu.

*Charakterizace<sup>i)</sup>:*

**TLC:** *i*-PrOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 7 : 3 : 3; *R<sub>f</sub>* = 0,4

**MS:** +996 [M – 2H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>; +1013 [M – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>; –971 [M – 2H<sub>2</sub>O – H]<sup>–</sup>; –989 [M – H<sub>2</sub>O – H]<sup>–</sup>; –1007 [M – H]<sup>–</sup>; –1025 [M + OH]<sup>–</sup>

**<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR:** (121,4 MHz; DMSO-*d*<sup>6</sup>): 37,5 (bs)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600,00 MHz; D<sub>2</sub>O): 1,76 (bs, 4H, *H*<sup>2</sup>); 2,53 (bs, 2H, *H*<sup>4</sup> nebo *H*<sup>5</sup>); 2,65 (bs, 2H, *H*<sup>1</sup> nebo *H*<sup>3</sup>); 2,71 (d, 4H, *H*<sup>6</sup>, <sup>2</sup>*J*<sub>PH</sub> = 12,2); 2,73 (bs, 2H, *H*<sup>4</sup> nebo *H*<sup>5</sup>); 2,75 (bs, 2H, *H*<sup>1</sup> nebo *H*<sup>3</sup>); 2,87 (bs, 2H, *H*<sup>4</sup> nebo *H*<sup>5</sup>); 2,92 (bs, 2H, *H*<sup>1</sup> nebo *H*<sup>3</sup>); 2,93 (bs, 2H, *H*<sup>1</sup> nebo *H*<sup>3</sup>); 3,06 (bs, 2H, *H*<sup>4</sup> nebo *H*<sup>5</sup>); 3,11 (d, 4H, *H*<sup>7</sup>, <sup>2</sup>*J*<sub>PH</sub> = 17,5); 3,65 (m, 2H, *H*<sup>6'</sup>); 3,81 (m, 2H, *H*<sup>6'</sup>); 3,97 (bs, 2H, *H*<sup>4'</sup>); 3,98 (m, 2H, *H*<sup>5'</sup>); 4,43 (bs, 2H, *H*<sup>3'</sup>); 4,50 (d, 2H, *H*<sup>2'</sup>, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,84); 6,09 (d, 2H, *H*<sup>1'</sup>, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,84); 7,31 (m, 4H, *H*<sup>10</sup>); 7,41 (m, 4H, *H*<sup>9</sup>);

<sup>i)</sup> Číslování uhlíků a k nim se vázajících vodíků je uvedeno na obrázku 7.2. Produkt je pravděpodobně směs anomerů α a β v rychlé rovnováze.

$^{13}\text{C-NMR-}\{^1\text{H}\}$ : (151,00 MHz;  $\text{D}_2\text{O}$ ): 24,1 ( $\text{C}^2$ ); 37,9 (d,  $\text{C}^7$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 82$ ); 46,3 ( $\text{C}^1$  nebo  $\text{C}^3$ ); 48,9 ( $\text{C}^1$  nebo  $\text{C}^3$ ); 51,8 (d,  $\text{C}^6$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 110$ ); 53,4 ( $\text{C}^4$  nebo  $\text{C}^5$ ); 58,6 ( $\text{C}^4$  nebo  $\text{C}^5$ ); 64,2 ( $\text{C}^{6'}$ ); 66,1 ( $\text{C}^{2'}$ ); 69,0 ( $\text{C}^{5'}$ ); 75,0 ( $\text{C}^{3'}$ ); 79,7 ( $\text{C}^{4'}$ ); 95,9 ( $\text{C}^{1'}$ ); 129,2 (d,  $\text{C}^{10}$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 2,4$ ); 131,3 (d,  $\text{C}^9$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 4,4$ ); 135,9 (d,  $\text{C}^8$ ,  $^1J_{\text{PC}} = 6,4$ ); 136,3 ( $\text{C}^{11}$ ); 182,1 ( $\text{C}^{12}$ )

# Kapitola 8

## Kinetická měření

### 8.1 Disociace komplexu [CuV]

Disociační kinetika měďnatého komplexu ligandu **V** byla zkoumána u jeho pentakoordinovaného izomeru *pc*-[CuV], izomer – *trans-Q,Q*-[CuV] vzhledem k časové náročnosti jeho přípravy nemá pro radiologické aplikace přílišný potenciál. Navíc podobně jako stejný izomer od měďnatého komplexu TE2P [14], tak i zde vykazuje *trans* izomer natolik velkou kinetickou inertnost, že je měření rychlostních konstant běžnými technikami špatně proveditelné.

#### 8.1.1 Příprava komplexu

Měďnatý komplex určený pro kinetická měření byl připraven takto:

V lékovce bylo ve 2 ml vody smícháno 41 mg ligandu **V** a 8,6 mg dihydrátu chloridu měďnatého (1,0 ekv.). Přídavkem 5% NaOH bylo pH upraveno na 5,02 a reakce byla při laboratorní teplotě míchána 1 hodinu. Poté bylo složení reakční směsi vyhodnoceno pomocí TLC a směs byla nanesena na kolonu s SiO<sub>2</sub>. Nejprve byl oddělen fialový izomer komplexu – *trans-Q,Q*-[CuV], a to vypláchnutím 5% NH<sub>3</sub> v EtOH, a poté byl oddělen požadovaný modrý izomer *pc*-[CuV] vypláchnutím 5% NH<sub>3</sub> ve vodě. Roztok byl odpařen do sucha, odparek byl rozpuštěn v malém množství vody, kvantitativně převeden do 10ml odměrné baňky a doplněn po rysku vodou. Tímto postupem bylo dosaženo koncentrace komplexu cca 5 mM.

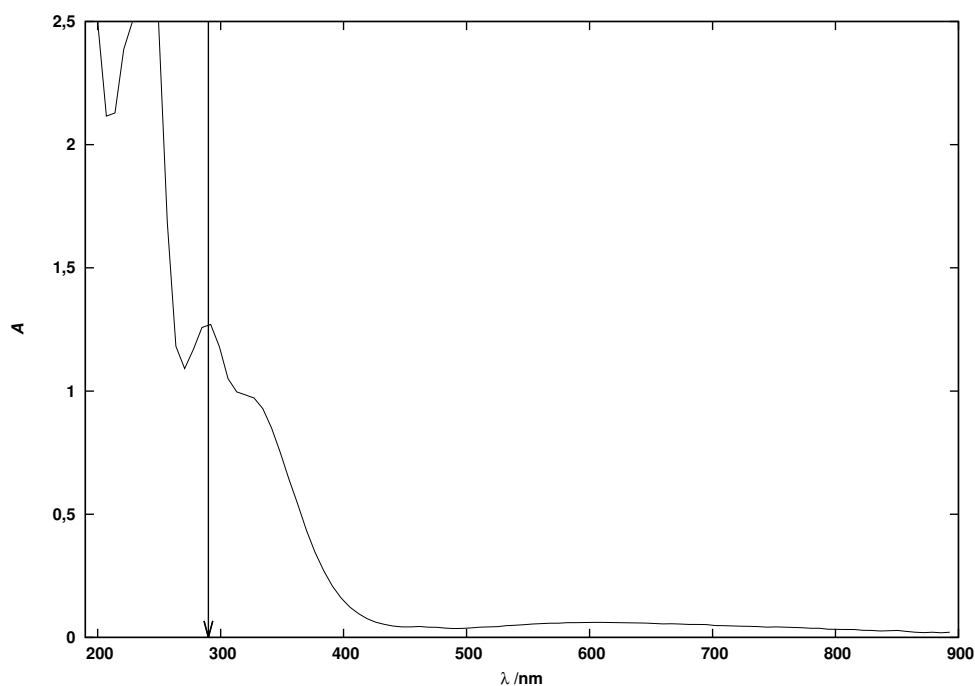
Čistota ověřena pomocí TLC: *i*-PrOH : NH<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O = 7 : 3 : 3; *R<sub>f</sub>* = 0,6.

Typická absorpční křivka připraveného komplexu zředěného na koncentraci 0,5 mM roztokem  $\text{NaClO}_4$  (celková  $I = 5,0$  M) na obrázku 8.1<sup>i)</sup>.

### 8.1.2 Příprava pomocných roztoků

Odměrný roztok hydroxidu sodného byl standardizován pomocí titrace dihydrátu kyseliny šťavelové. Přesná koncentrace  $c_{\text{NaOH}} = 0,103$  M. Tímto roztokem byla titrována kyselina chloristá o přibližné koncentraci 5,5 M a přidavkem vody byla její koncentrace upravena přesně na 5,43 M.

Pomocný roztok chloristanu sodného o koncentraci 5,5 M byl připraven ve 250ml odměrné baňce rozpuštěním 193,13 g chloristanu sodného ve vodě a doplněním na 250,0 ml. Chloristan o koncentraci 5,5 M byl zvolen kvůli udržení konstantní iontové síly 5,0 M během celého měření.



Obrázek 8.1: Absorpční spektrum *trans*-[CuV]

---

<sup>i)</sup>Šipka označuje 290 nm, tj. vlnovou délku světla použitou pro kinetická měření.

### 8.1.3 Měření

Pro každou z měřených teplot byla provedena série kinetických experimentů při různých koncentracích kyseliny. Složení jednotlivých reakčních směsí jsou uvedena v tabulce 8.1 a udávají objemy roztoku 5,43M  $\text{HClO}_4$ , 5,5M  $\text{NaClO}_4$  a roztoku komplexu použitých pro získání 1 ml měřeného roztoku.<sup>ii)</sup>

**Tabulka 8.1:** Složení roztoků pro měření disociačních kinetik  $[\text{CuV}]$

$c_{\text{HClO}_4}/\text{M}$	$V_{\text{HClO}_4}/\mu\text{l}$	$V_{\text{NaClO}_4}/\mu\text{l}$	$V_{[\text{CuV}]}/\mu\text{l}$
4,89	900	0	100
3,99	735	165	100
3,01	555	345	100
2,01	370	530	100
1,00	185	715	100
0,75	140	760	100
0,50	92	808	100
0,25	46	854	100
0,10	18	882	100

Do 1cm křemenné kyvety byla napipetována kyselina a roztok chloristanu a v karuselu spektrofotometru byla kyveta vytemperována na danou teplotu. Poté byla kyveta vyjmuta ze spektrofotometru, bylo rychle přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku komplexu, otočením byl objem kyvety promíchán a kyveta umístěna zpět do karuselu. Ihned byl spuštěn kinetický experiment, tj. byla měřena závislost absorpance při 290 nm na čase. Doba experimentu byla měněna v závislosti na rychlosti disociace v rozmezí 10 min až několika hodin. Pro každou koncentraci kyseliny byla změřena rychlost disociace komplexu při teplotách 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 a 70,0 °C s tolerancí přibližně  $\pm 0,2$  °C.

<sup>ii)</sup> Objemová kontrakce byla s ohledem na podobný vodný charakter roztoků zanedbána.

## 8.2 Formační kinetiky

### 8.2.1 Příprava zásobních roztoků

Kyselina chloroctová pro chloracetátový pufr byla vyčištěna dvojnásobou rekrystalizací za horka nasyceného vodného roztoku. Do 100ml odměrné baňky bylo naváženo 0,315 g této kyseliny a doplněno po rysku vodou, čímž byl získán 0,033 M roztok.

Roztok kyseliny fosforečné pro přípravu fosfátového pufru byl získán naředěním 95 mg 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve 25ml odměrné baňce po rysku vodu, čímž byl připraven roztok o koncentraci 0,033 M.

Kyselina octová na acetátový pufr o koncentraci 0,033 M byla připravena naředěním 50 mg 99 % kyseliny octové na 25,0 ml v odměrné baňce.

Roztok chloridu draselného o koncentraci 0,20 M určený k udržování konstantní iontové síly byl připraven rozpuštěním 1,491 g chloridu draselného ve vodě a naředěním na 100 ml.

K vytvoření pufrů o vhodném pH z výše uvedených kyselin byl použit 5% KOH připravený rozpuštěním 5 g KOH ve vodě a jeho naředěním na 100 ml. Roztok ligandu o koncentraci 1,02 mM byl připraven rozpuštěním 8,4 mg ligandu ve vodě a naředěním na 10,0 ml v odměrné baňce.

Chlorid měďnatý o koncentraci 50,0 mM byl připraven rozpuštěním 85,2 mg  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve vodě a naředěním na 10,0 ml v odměrné baňce.

Rychlost vzniku měďnatého komplexu ligandu **V** byla sledována spektrofotometricky při 290 nm, při teplotě  $25,0 \pm 0,1$  °C, koncentraci ligandu 102  $\mu\text{M}$ , s iontovou silou 0,1 M, za různých hodnot pH a koncentrace mědi  $c_{\text{Cu}} = 1$  až 5 mM.

### 8.2.2 Závislost $k_{\text{obs}}$ na koncentraci kovu

Aby mohlo být pro vyhodnocování využito kinetiky pseudoprvního řádu vůči ligandu, bylo nejprve potřeba prověřit lineární závislost  $k_{\text{obs}}$  na koncentraci měďnatých kationtů v roztoku. Tato závislost byla měřena pro pH  $3,24 \pm 0,04$ .

Reakční směsi obsahovaly 100, 80, 60, 40 a 20  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{CuCl}_2$ , přičež bylo dále přidáno vždy 300  $\mu\text{l}$  chloracetátového pufru o pH 3,01, 100  $\mu\text{l}$  roztoku ligandu a roztok KCl tak, aby výsledný objem byl 1 ml. Do 1cm křemenné

kyvety byly nejprve přidány veškeré látky kromě chloridu měďnatého. Kyveta byla následně temperována v karuselu spektrofotometru. Poté bylo rychle přidáno uvedené množství roztoku  $\text{CuCl}_2$ , roztok byl promíchán otočením kyvety a ihned bylo spuštěno měření.

### 8.2.3 Závislost $k_{\text{obs}}$ na pH

Reakční směsi se skládaly vždy ze 100  $\mu\text{l}$  roztoku  $\text{CuCl}_2$ , 100  $\mu\text{l}$  ligandu, 500  $\mu\text{l}$  roztoku KCl a 300  $\mu\text{l}$  pufru o pH a typu uvedeném v tabulce 8.2.

**Tabulka 8.2:** Použité pufrы a jejich pH v reakčních směsích (A – acetátový pufr, C – chloracetátový pufr, P – fosfátový pufr)

pH	typ	pH	typ	pH	typ
2,00	P	3,01	C	4,44	A
2,49	P	3,74	C	5,04	A
2,85	P	4,20	C	5,28	A

Při přípravě vzorku se postupovalo tak, že veškeré komponenty vzorku vyjma měďnatých iontů byly smíchány v 1cm křemenné kyvetě a pomocí pH elektrody byla zjištěna výchozí hodnota pH. Následně byla kyveta temperována v karuselu spektrofotometru. Poté bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku chloridu měďnatého, kyveta byla promíchána otočením a ihned byl spuštěn kinetický experiment. Doba experimentu byla volena podle složení roztoku v rozmezí několika minut až několik hodin. Po ukončení měření byla znovu změřena hodnota pH. Jako výsledná hodnota pH byl využit aritmetický průměr obou počáteční a konečné hodnoty pH a jako chyba pak polovina rozdílu těchto hodnot pH.

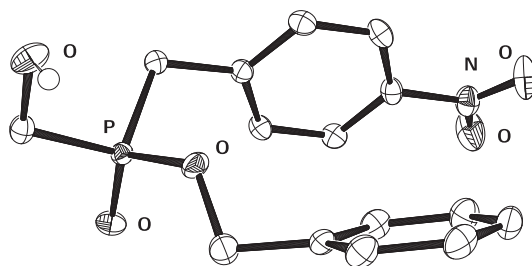
# Kapitola 9

## Diskuze

### 9.1 Syntéza ligandu

#### 9.1.1 Alkylační činidla

Přestože příprava alkylačních činidel pro získání cílového ligandu není příliš náročná, samotná alkylace je velmi komplikovaná, má poměrně malé výtěžky, složitou separaci produktů z reakční směsi, nebo je celkově špatně říditelná směrem k požadovanému produktu.

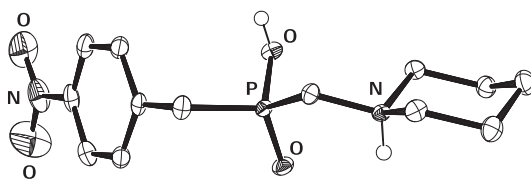


**Obrázek 9.1:** Molekulová struktura látky  $\text{NBHMPin}^{\text{OBn}}$  z její krystalové struktury

Dalším problémem je vhodné chránění fosfinové kyseliny, jelikož při použití ethylesteru přicházejí problémy s ochráněním. Benzylesterové chránění je naopak nevhodné v důsledku benzylačných vlastností  $\text{MesNBHMPin}^{\text{OBn}}$ . Lze také polemizovat, zda-li není ethyl ve sloučeninách **I** a **II** přítomen v molekule na jiném místě než jako ester (v důsledku možných ethylačních vlastností



MesNBHMPin<sup>OEt</sup>). Tato hypotéza však nebyla prokázána žádným experimentem a samotná poloha ethylové skupiny je v <sup>1</sup>H-NMR spektru látek **I** a **II** obtížně určitelná. Struktura látek NBHMPin<sup>OBn</sup> a **IIIb** byla ověřena také rentgenostrukturní analýzou a získané molekulární struktury jsou uvedeny na obrázcích 9.1 a 9.2.



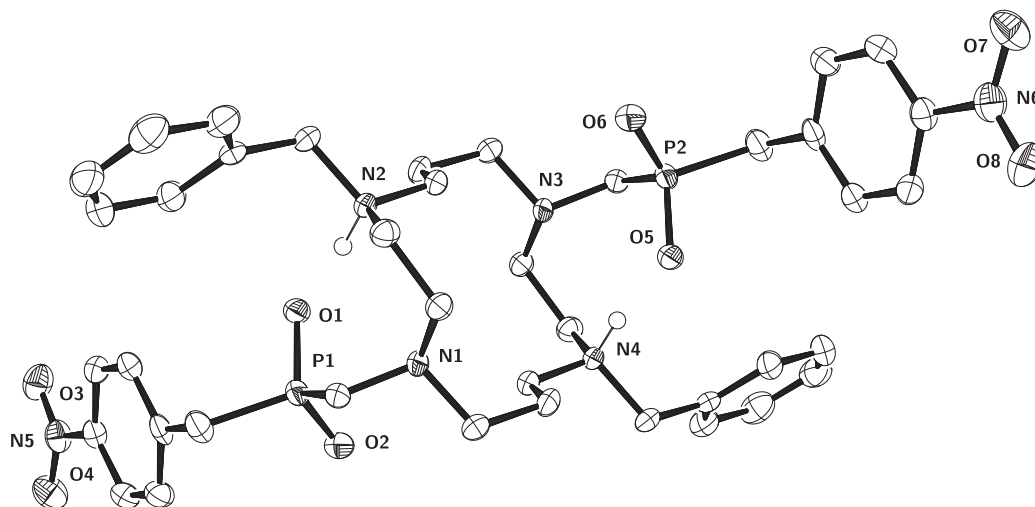
**Obrázek 9.2:** Molekulová struktura látky H(**IIIb**)<sup>+</sup> nalezená v krystalové struktuře látky **IIIb**·HCl

### 9.1.2 Syntéza Fieldsovou-Kabachnikovou reakcí

Klasické provedení této reakce ve směsi HCl : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 selhává z důvodu nerozpustnosti výchozího 1,8-dibenzylcyclamu. Nejlepším rozpouštědlem se ukázala být 99% AcOH.

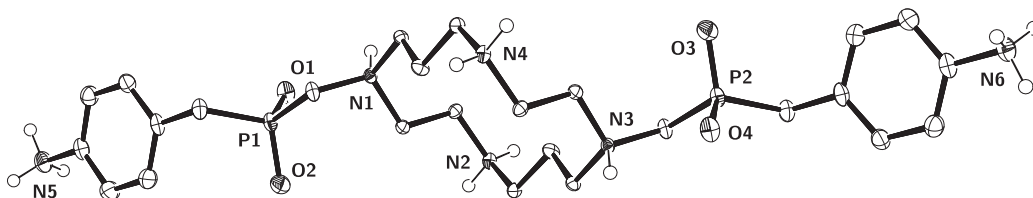
Příprava cílového ligandu **V** přes meziprodukt **IV** umožňuje snadným, rychlým a poměrně levným způsobem připravit produkt s dobrým výtěžkem. Syntéza látky **IV** neposkytuje sice produkt ve stoprocentní čistotě, což je dáno především poněkud nestandardním způsobem krystalizace, ale nečistoty jsou anorganické povahy, nijak neinterferují a v dalších reakčních krocích jsou odstraněny.

Redukce z látky **IV** na látku **V** je velmi rychlá, riziko rozkladu produktu na katalyzátoru lze dobře minimalizovat sledováním reakční směsi vhodnou analytickou metodou, např. MS. Podobně jako u jiných reakcí na pevných katalyzátorech je i zde problém se zvýšením výchozích navážek reaktantů, jelikož při větším objemu reakční směsi nelze jednoduše zajistit stejné reakční podmínky, především nasycenost rozpouštědla vodíkem, celá reakce musí tím pádem probíhat po delší dobu a zvyšuje se míra degradace produktu na katalyzátoru.



**Obrázek 9.3:** Molekulová struktura látky **IV** nalezená v krystalové struktuře látky **IV**·8MeOH

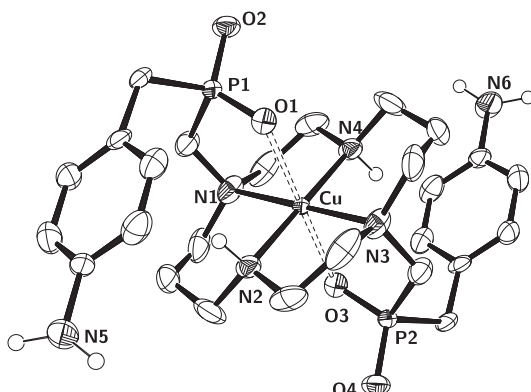
Od látek **IV** i **V** byly získány krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Získané struktury jsou uvedeny na obrázcích 9.3 a 9.4. Látka **IV** krystalizuje ve formě solvátu s 8 MeOH (na obrázku 9.3 jsou pro přehlednost vynechány). Produkt **V** krystalizuje jako hexahydrobromid dekahydrát (na obrázku 9.4 taktéž vynecháno).



**Obrázek 9.4:** Molekulová struktura látky  $(\text{H}_4\text{V})^{4+}$  nalezená v krystalové struktuře látky **V**·6HBr·8H<sub>2</sub>O

## 9.2 Struktura komplexů

Podarilo se připravit oba očekávané izomery [14] komplexu  $[\text{CuV}]$ , přičemž od isomeru *trans-O,O*- $[\text{CuV}]$  byl získán krystal vhodný pro rentgenovou strukturní analýzu. Výsledná struktura je uvedena na obrázku 9.5.



**Obrázek 9.5:** Molekulová struktura komplexu *trans*-QO-[CuV] nalezená v krystalové struktuře látky *trans*-QO-[CuV]·12H<sub>2</sub>O

Z obrázku 9.5 je patrné Jahnovo-Tellerovo prodloužení koordinačního oktaedru s atomy kyslíku v apikálních polohách. Molekula má jednu dvojitou rotační osu symetrie. Vazebné parametry donorových atomů jsou:

Vzdálenosti: |O1Cu| = 2,346 Å, |N1Cu| = 2,097 Å a |N2Cu| = 2,013 Å.

Úhly: |∠ N1CuN2| = 93°, |∠ N1CuN4| = 87°, |∠ N1CuO1| = 95° a  
|∠ N2CuO1| = 85°.

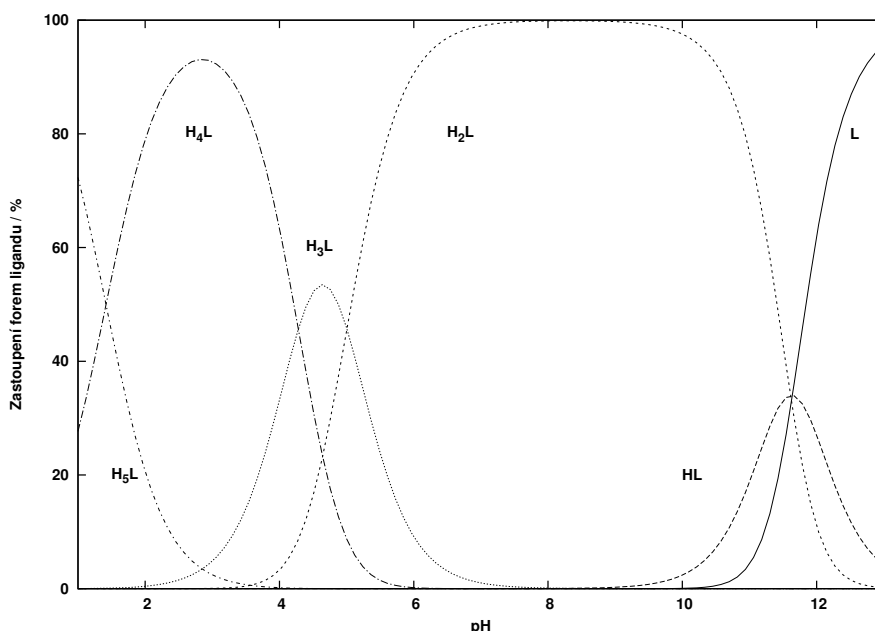
Dle nomenklatury zavedené v [34] se jedná o izomer *trans*(III).

### 9.3 Biokonjugace

Aromatický amin ligandu **V** je ideálním prekurzorem pro zavedení isothiokyanátové skupiny. Jako model by zvolen glukosamin, především proto, že se jedná o poměrně dostupnou látku, produkt reakce s ní je ve vodě rozpustný a relativně dobře čistitelný ultrafiltrací. S největší pravděpodobností budou i reakce se složitějšími aminosacharidy probíhat velmi podobně. Takto modifikovaný ligand by poté mohl mít afinitu k lektinovým receptorům na buněčných površích.

Samotná syntéza isothiokyanátového prekurzoru je velmi jednoduchá a rychlá jednokroková reakce. Spojení s glukosaminem je možné, avšak pro účely konjugací s komplikovanějšími a dražšími aminopolysacharidy jsou hledány reakční podmínky, při kterých nebude docházet k degradaci sacharidu a nebude zapotřebí jeho velkého nadbytku.

## 9.4 Termodynamická data



**Obrázek 9.6:** Distribuční diagram ligandu **V** ( $c_L = 4 \text{ mM}$ )

Z potenciometrických titrací byly získány protonizační konstaty volného ligandu, konstanta stability a protonizační konstaty měďnatého komplexu.

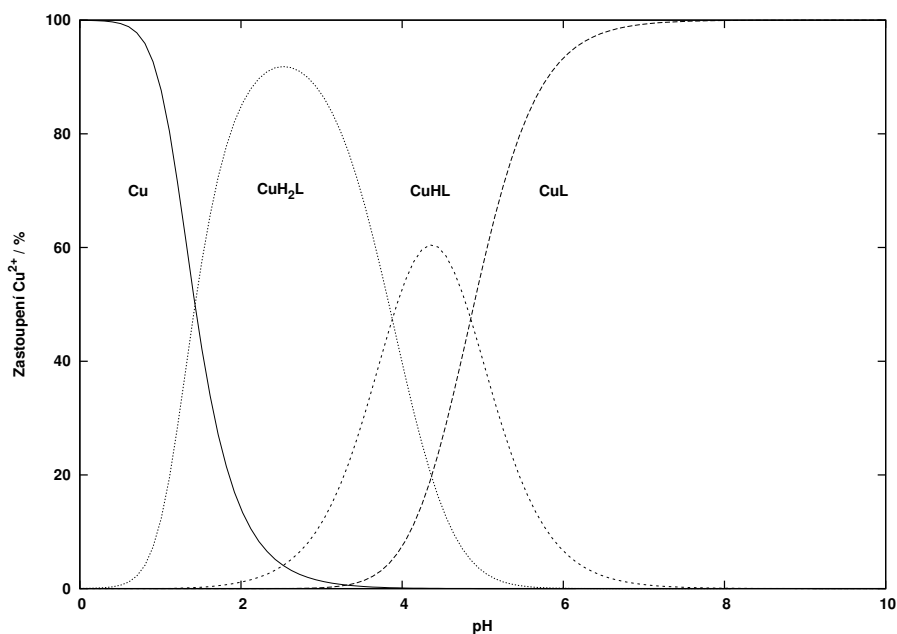
Titrace volného ligandu i měďnatého komplexu byly provedeny ve směru z kyselého (upraveno 0,003M  $\text{HNO}_3$ ) do bazického prostředí pomocí KOH. Veškerá měření byla prováděna při 25 °C a iontové síle 0,1 M ( $\text{KNO}_3$ ). Použité koncentrace ligandu a kovu byly stejné – 0,004 M. Díky relativně pomalé kinetice vzniku a rozkladu komplexu byly titrace měďnatého komplexu provedeny „baničkovou“ metodou – roztoky o složení pro daný bod byly namíchány do zkumavek a pH bylo změřeno až po třech dnech. Při titraci volného ligandu bylo naměřeno celkem šest titrací po šedesáti bodech a při titraci komplexu osm titrací po čtrnácti bodech. Z titračních křivek byly termodynamické parametry fitovány programem Opium [18].

Výsledná data jsou uvedena v tabulkách 9.1 a 9.2. Na obrázcích 9.6 resp. 9.7 jsou uvedeny distribuční diagramy ligandu respektive jeho měďnatého komplexu v závislosti na pH. Těmto termodynamickým parametrům odpovídá  $\text{pH}^{99} = 3,11$  čímž se ligand ukazuje být jedním z nejlepších ze všech v teoretické části uvedených derivátů cyklamu.

Pomocí TLC bylo ověřeno, že komplex vznikající při termodynamických měřeních je modrý izomer  $pc$ -[CuV].

**Tabulka 9.1:** Protonizační konstaty ligandu V

$h$	$\log \beta_h$	$\log K_h$
1	$11,64 \pm 0,02$	$11,64 \pm 0,02$
2	$23,25 \pm 0,01$	$11,61 \pm 0,03$
3	$28,26 \pm 0,01$	$5,01 \pm 0,02$
4	$32,54 \pm 0,01$	$4,28 \pm 0,02$
5	$33,96 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,03$



**Obrázek 9.7:** Distribuční diagram systému Cu–V ( $c_L = c_{Cu} = 4$  mM)

**Tabulka 9.2:** Konstanta stability a protonizační konstaty komplexu  $pc$ -[CuV]

$h \ l \ m$	$\log \beta_{hlm}$	$\log K_{hlm}$
0 1 1	$23,94 \pm 0,07$	$23,94 \pm 0,07$
1 1 1	$28,80 \pm 0,07$	$4,9 \pm 0,1$
2 1 1	$32,67 \pm 0,07$	$3,9 \pm 0,1$

## 9.5 Disociační kinetiky

Data byla zpracována algoritmy pro nelineární regresi v programu Gnuplot [33] podle následujících rovnic:

Závislost absorbance  $A$  na čase byla fitována kinetikou prvního řádu:

$$A(t) = A_0 e^{-k_{\text{obs}} t} + A_{\infty}. \quad (9.1)$$

K popisu závislosti  $k_{\text{obs}}$  na koncentraci kyseliny byla použita již v úvodu popsaná rovnice:

$$k_{\text{obs}}([\text{H}^+]) = \frac{k_0 + k_1 K[\text{H}^+]}{1 + K[\text{H}^+]}. \quad (9.2)$$

Pro závislost rychlostních konstant  $k_0$  a  $k_1$  na teplotě bylo použito Arrheniovy (9.3) a také Eyringovy (9.4) rovnice:

$$k(T) = Q e^{-\frac{E_A}{RT}}, \quad (9.3)$$

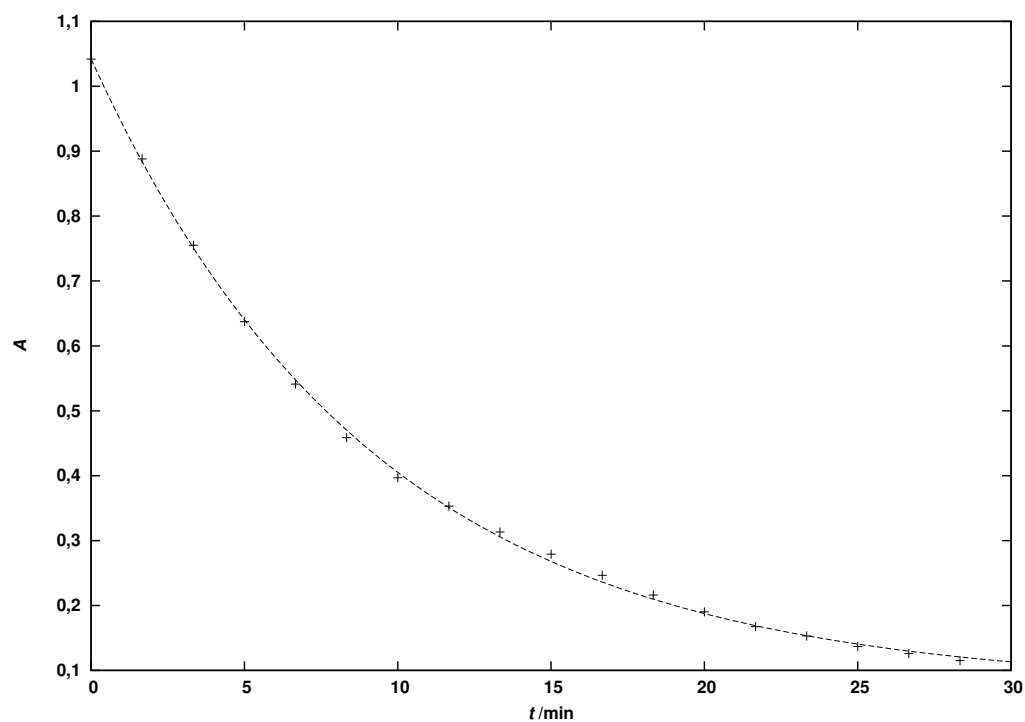
$$k(T) = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}, \quad (9.4)$$

Pro popis změn rovnovážné konstanty  $K$  s teplotou byl použit z termodynamiky známý výraz pro chemickou rovnováhu (9.5):

$$K(T) = e^{\frac{\Delta S^0}{R}} e^{-\frac{\Delta H^0}{RT}}, \quad (9.5)$$

kde  $R$  je univerzální plynová konstanta ( $8,315 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $Q$  je arrheniovský předexponenciální parametr,  $E_A$  je aktivační energie disociace. Dále  $k_B$  je Boltzmanova konstanta ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $h$  Planckova konstanta ( $6,63 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $\Delta S^\ddagger$  a  $\Delta H^\ddagger$  jsou aktivační entropie a entalpie reakce,  $\Delta H^0$  je změna entalpie reakce a  $\Delta S^0$  je změna entropie reakce.

### 9.5.1 Zpracování dat



**Obrázek 9.8:** Příklad kinetického měření pro  $T = 50\text{ °C}$ ,  $[\text{H}^+] = 1,00\text{ M}$  a  $I = 5,0\text{ M}$

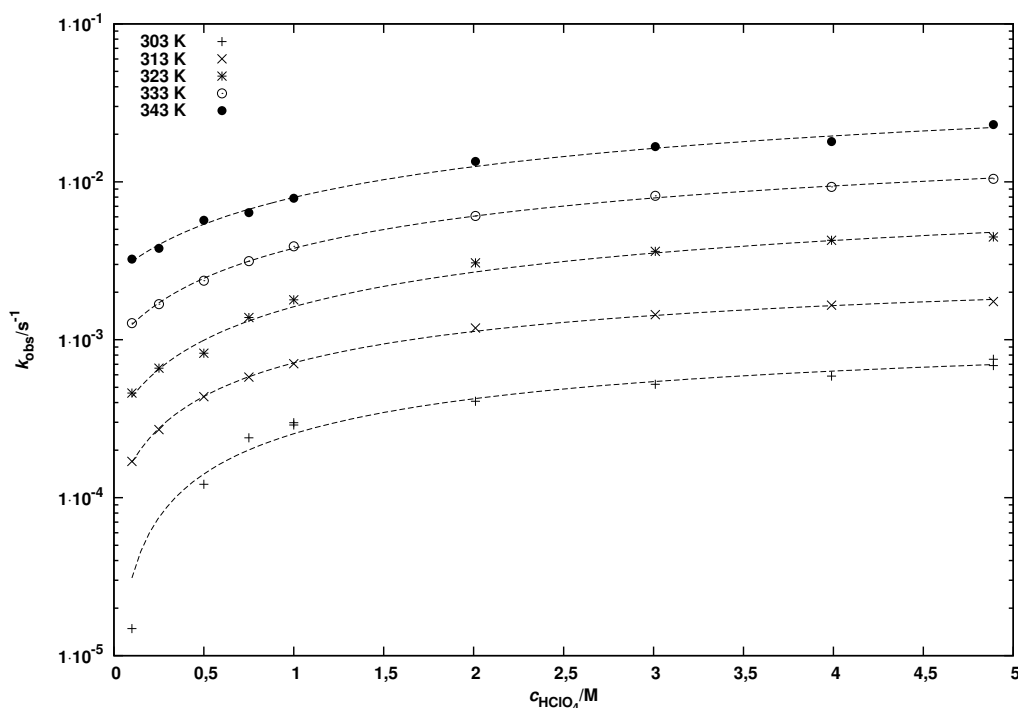
**Tabulka 9.3:** Výsledné hodnoty disociačních kinetických parametrů

$T/\text{K}$	$k_0/\text{s}^{-1} \times 10^5$	$k_1/\text{s}^{-1} \times 10^3$	$K \times 10$
303	$< 1$ (odhad)	$1,3 \pm 0,2$	$2,5 \pm 6$
313	$9,2 \pm 6$	$3,2 \pm 0,2$	$2,5 \pm 2$
323	$29 \pm 6$	$12 \pm 4$	$1,3 \pm 0,6$
333	$93 \pm 4$	$25 \pm 2$	$1,3 \pm 0,2$
343	$250 \pm 20$	$62 \pm 18$	$1,0 \pm 0,4$

Jako příklad typické závislosti  $A$  na čase je uveden graf na obrázku 9.8, pro teplotu  $T = 323,2$  K, koncentraci kyseliny  $[\text{H}^+] = 1,00$  M a iontovou sílu  $I = 5,0$  M.

Získané  $k_{\text{obs}}$  byly vyneseny v závislosti na koncentraci kyseliny pro každou teplotu a byly proloženy závislostí dle rovnice (9.2). Výsledné závislosti pro jednotlivé teploty jsou na obrázku 9.9.

Získané parametry (včetně jejich směrodatných odchylek) uvádí tabulka 9.3.



**Obrázek 9.9:** Závislost  $k_{\text{obs}}$  na čase

V grafech na obrázcích 9.10, 9.11 a 9.12 jsou vyneseny hodnoty  $k_0$ ,  $k_1$  a  $K$  ve linearizovaných formách rovnic (9.3), (9.4) a (9.5) proti absolutní teplotě  $T$ . Tedy dle rovnic (9.6), (9.7) a (9.8), kde „a“ je směrnice a „b“ úsek při lineární regresi.

$$\ln k(T) = \underbrace{\ln Q}_{\text{b}} - \underbrace{\frac{E_{\text{A}}}{R}}_{\text{a}} \frac{1}{T}, \quad (9.6)$$



$$\ln \frac{k(T)}{T} = \underbrace{\ln \frac{k_B T}{h}}_b + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \underbrace{\frac{\Delta H^\ddagger}{R}}_a \frac{1}{T} \quad (9.7)$$

$$\ln K(T) = \underbrace{\frac{\Delta S^0}{R}}_b - \underbrace{\frac{\Delta H^0}{R}}_a \frac{1}{T} \quad (9.8)$$

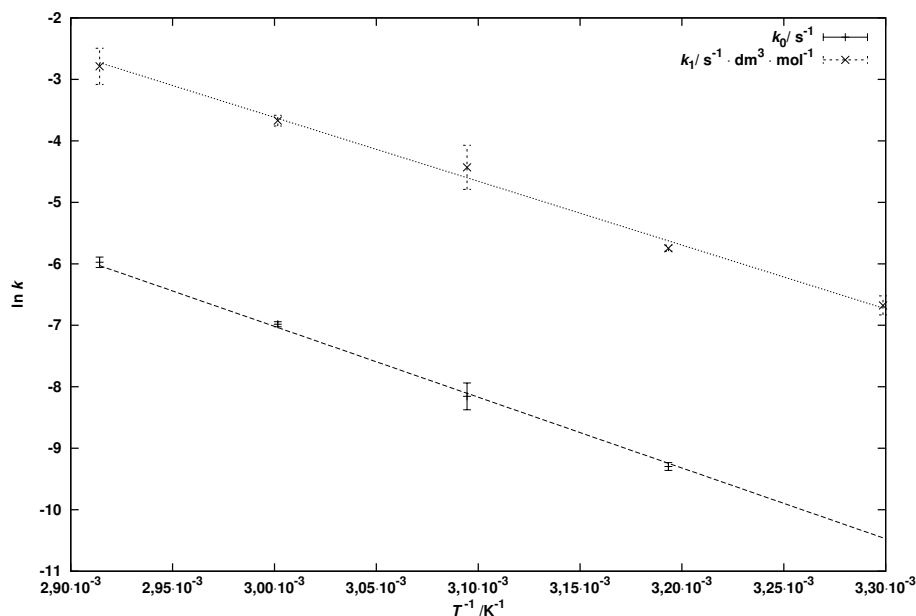
Vypočtené aktivační parametry (včetně jejich směrodatných odchylek) jsou uvedeny v tabulce 9.4. Získané rovnovážné veličiny jsou uvedené v tabulce 9.5.

**Tabulka 9.4:** Aktivační parametry

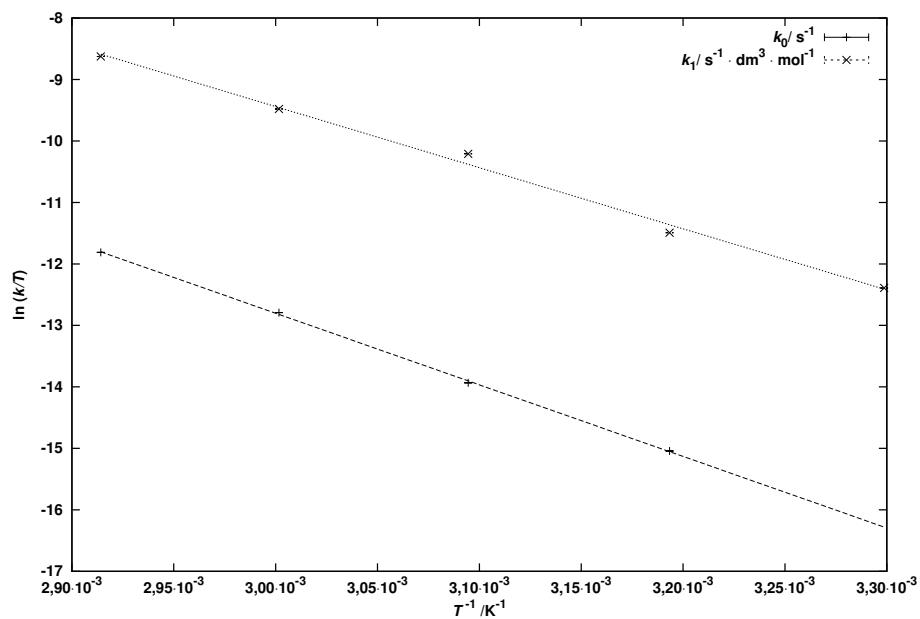
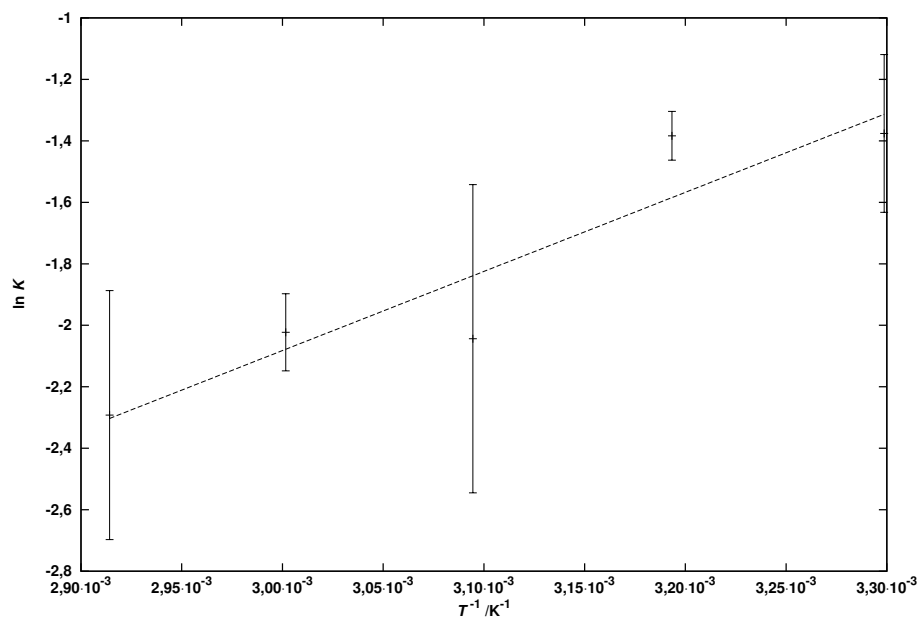
	$E_A/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger/\text{J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger/\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
$k_0$	$100 \pm 1$	$-14 \pm 4$	$97 \pm 1$
$k_1$	$85 \pm 3$	$-20 \pm 9$	$86 \pm 3$

**Tabulka 9.5:** Parametry fitu  $K$  na teplotě

$$\begin{aligned} \Delta H^0 &= -21 \pm 5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ \Delta S^0 &= -80 \pm 15 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \end{aligned}$$



**Obrázek 9.10:** Závislost  $k_0$  a  $k_1$  na  $T$  linearizovaná dle Arrheniovy rovnice

Obrázek 9.11: Závislost  $k_0$  a  $k_1$  na  $T$  linearizovaná dle Eyringovy rovniceObrázek 9.12: Linearizovaná závislost  $K$  na teplotě

### 9.5.2 Hodnocení

K extrapolaci dat na teplotu 25 °C bylo použito lineární extrapolace.<sup>i)</sup> Vzhledem k přesnosti získaných dat lze odhadnout poločas rozkladu komplexu  $\tau_{1/2}$   $pc$ -[CuV] při 25 °C iontové síle  $I = 5,0$  M a koncentraci kyseliny chloristé  $c_{\text{HClO}_4} = 1,0$  M přibližně na  $\tau_{1/2} = 1,1$  h. To řadí komplex  $pc$ -[CuV] mezi velmi inertní komplexy.

## 9.6 Formační kinetiky

Závislost absorbance na čase byla fitována kinetikou pseudoprvního řádu dle rovnice (9.9):<sup>ii)</sup>

$$A(t) = A_{\infty}(1 - e^{-k_{\text{obs}}t}), \quad (9.9)$$

kde  $A_{\infty}$  je absorbance v nekonečném čase.

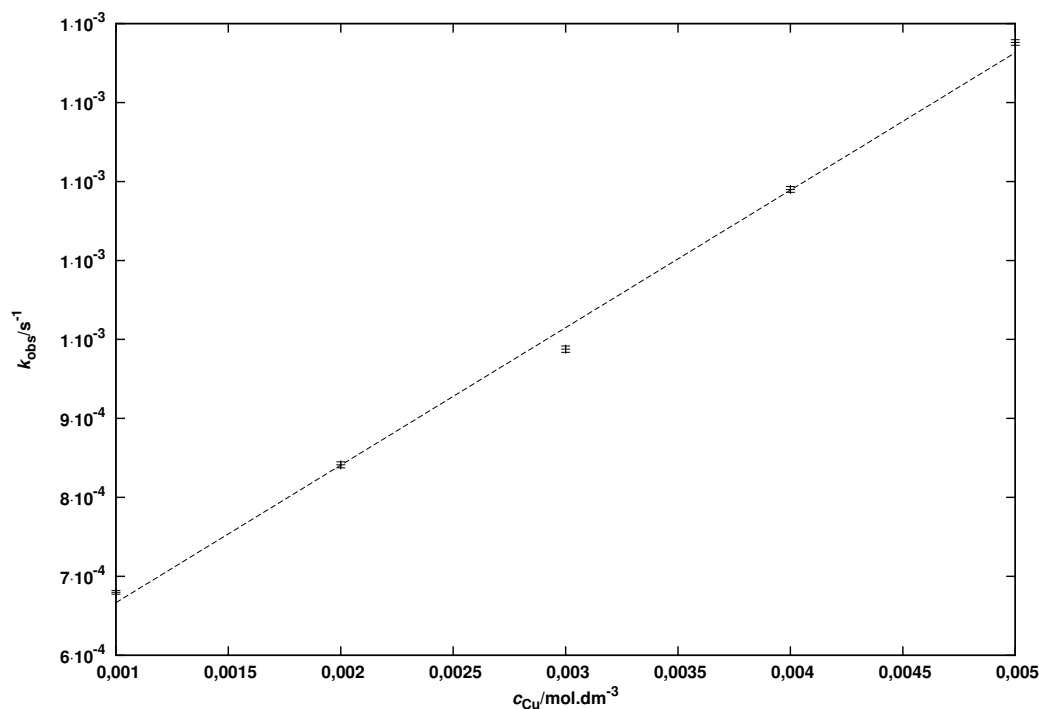
### 9.6.1 Závislost na koncentraci mědi

Abychom získali skutečnou konstantu druhého řádu  $k_{\text{sec}}$  splňující rovnici  $v = k_{\text{sec}}c_{\text{Cu}}c_{\text{L}}$ , je potřeba získanou konstantu pseudoprvního řádu  $k_{\text{obs}}$  vydělit analytickou koncentrací měďnatých iontů  $c_{\text{Cu}}$  ve vzorku. Oprávněnost této operace byla ověřena sadou měření při pH  $3,24 \pm 0,04$ , teplotě 25 °C a iontové síle 0,1 M při různých koncentracích mědi, jak ukazuje graf na obrázku 9.13.

Je zcela zřejmé, že se jedná o dobrou lineární závislost s chybou ve směrnici a úseku do 5 %.

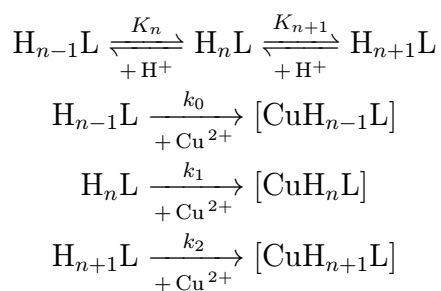
<sup>i)</sup>Linearizace dle Arrheniovy i Eyringovy rovnice poskytuje v rámci celkové chyby stejné výsledky.

<sup>ii)</sup>Závislost byla posunuta tak, aby  $A(t = 0) = 0$ .

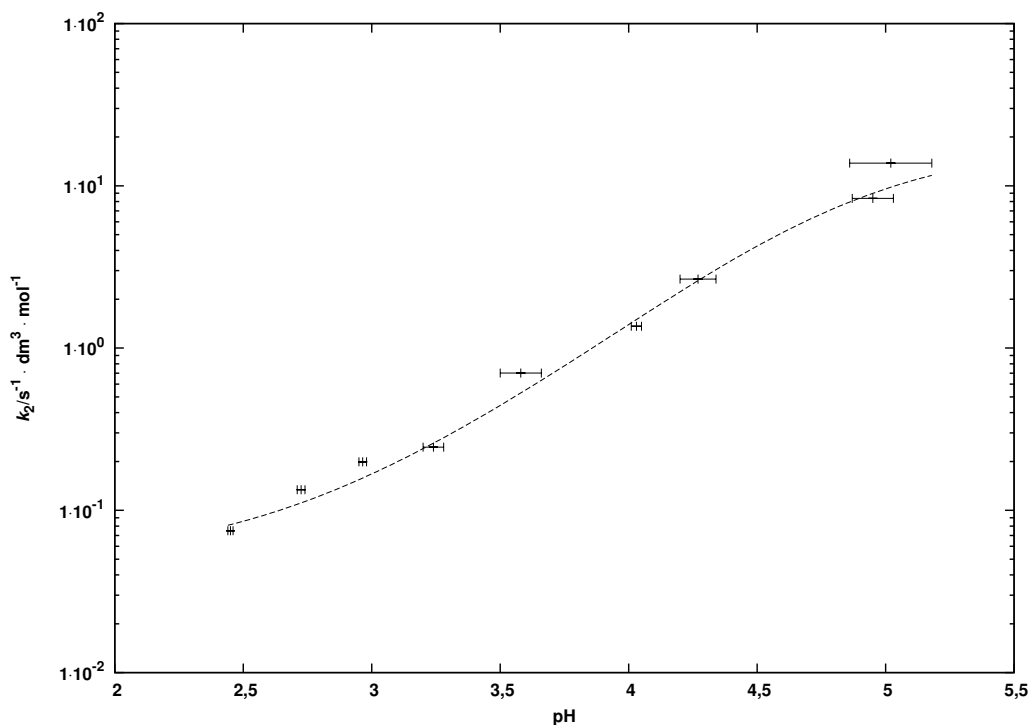
Obrázek 9.13: Závislost  $k_{\text{obs}}$  na  $c_{\text{Cu}}$ 

### 9.6.2 Závislost na pH

Získané  $k_{\text{sec}}$  pro různé pH byly vyneseny do grafu na obrázku 9.14 a proloženy rovnicí (9.10) odpovídající tříčásticovému modelu na následujícím schématu:



$$k_{\text{sec}} = \frac{k_0 + k_1 K_n [\text{H}^+] + k_2 K_{n+1} [\text{H}^+]^2}{1 + K_n [\text{H}^+] + K_{n+1} [\text{H}^+]^2}. \quad (9.10)$$



Obrázek 9.14: Závislost  $k_{\text{sec}}$  na pH

Vzhledem ke komplikovanosti modelu byly hodnoty protonizačních konstant fixovány na hodnotách získaných potenciometrickou titrací. Jako nejpravděpodobnější hodnota  $n$  se ukázalo  $n = 3$ , tedy reagujícími částicemi je dvakrát, třikrát a čtyřikrát protonizovaný ligand (viz distribuční diagram na obrázku 9.7). Hodnoty získaných rychlostních konstant a také použité rovnovážné konstanty uvádí tabulka 9.6.

**Tabulka 9.6:** Parametry vzniku měďnatého komplexu ligandu **V** pro pH v rozmezí 2–5, teplotu  $25,0 \pm 0,1$  °C a iontovou sílu  $I = 0,1$  M

$k_0 = 19 \pm 3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
$k_1 = 2,3 \pm 0,4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{dm}^6 \cdot \text{mol}^{-2}$
$k_2 = 0,05 \pm 0,01 \text{ s}^{-1} \cdot \text{dm}^9 \cdot \text{mol}^{-3}$
$K_n \equiv K_3 = 1,02 \times 10^5$
$K_{n+1} \equiv K_4 = 1,91 \times 10^4$

Podobný rozměr všech tří rychlostních konstat ukazuje, že různě protonizované částice se výrazně neliší ve své reaktivitě. Centra protonizace jsou tedy

pravděpodobně na aromatických aminech ligandu **V**. Z vlastností podobných ligandů lze předpokládat, že při vyšších hodnotách pH by se rychlost dále zvyšovala a to pravděpodobně velmi prudce, jelikož by se projevila reaktivita částic s deprotonizovanými dusíky cyklu. Ověření této hypotézy však není bez použití speciálních experimentálních procedur, například stoped-flow měření, možné.

# Kapitola 10

## Závěr

V rámci této bakalářské práce:

- Byly srovnány dostupné kinetické a termodynamické parametry vybraných ligandů a jejich měďnatých komplexů.
- Bylo připraveno 19 látek, z toho 12 zcela nových.
- U pěti z nich byla struktura ověřena rentgenovou strukturní analýzou.
- U pentakoordinovaného isomeru komplexu  $[\text{CuV}]$  byla prostudována kinetika vzniku a kyselá disociace komplexu v kyselém prostředí.
- S ohledem na zjištěné kinetické parametry a s přihlédnutím k termodynamickým vlastnostem tohoto komplexu se ligand **V** ukázal jako vhodný k dalším studiím, především jako bifunkční ligand.
- Na modelové molekule glukosaminu byla prostudována možnosti isothiokyanátového kaplinku na aminosacharidy.

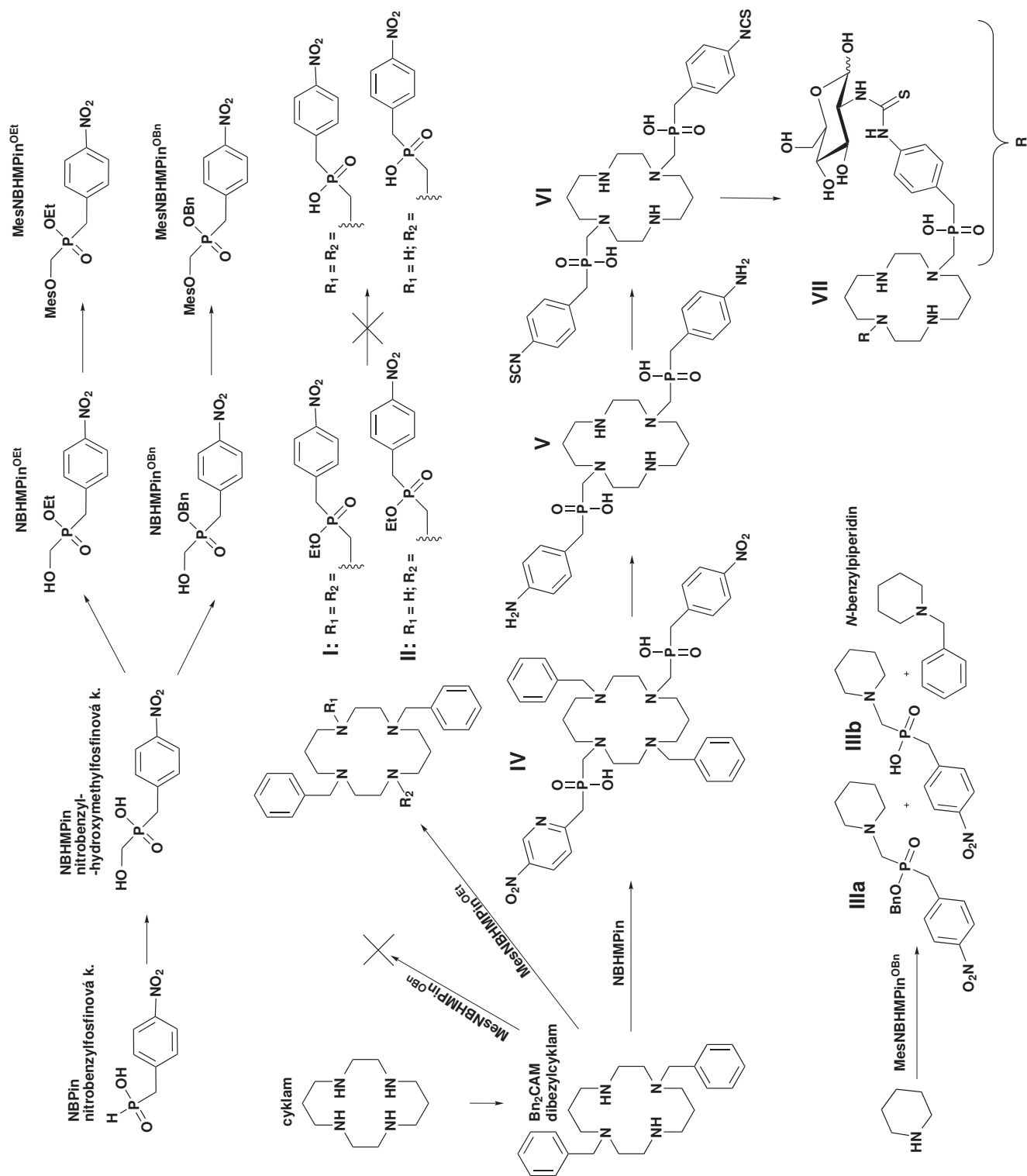




## Část III

### Přílohy

## A Celkové syntetické schéma



## B Rengenostrukturní data

V následující tabulce jsou uvedeny některé parametry získané při rentgenostrukturních analýzách produktů.

	<b>IV</b> ·8MeOH	NBHMPin <sup>OBn</sup>	<b>IIIb</b> ·HCl	<i>trans</i> -O <sub>2</sub> Q-[Cu <b>V</b> ] <sup>+</sup> ·12H <sub>2</sub> O	<b>V</b> ·6HBr·8H <sub>2</sub> O
vzorec	C <sub>48</sub> H <sub>77</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> P <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>5</sub> P	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> P	C <sub>26</sub> H <sub>66</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>16</sub> P <sub>2</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>66</sub> Br <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub>
<i>M<sub>r</sub></i>	1063,15	321,26	334,73	844,33	1196,25
<i>a</i>	10,1797(17) Å	7,4834(16) Å	5,9469(2) Å	9,1450(11) Å	17,8427(6) Å
<i>b</i>	10,9863(19) Å	5,7056(12) Å	9,4798(4) Å	9,6380(11) Å	7,9682(2) Å
<i>c</i>	13,363(2) Å	34,660(7) Å	14,4294(6) Å	19,752(2) Å	18,3151(6) Å
$\alpha$	72,600(6)°	90°	104,6270(10)°	91,155(4)°	90°
$\beta$	83,782(6)°	96,162(5)°	92,873(2)°	90,284(4)°	117,8600(10)°
$\gamma$	80,209(6)°	90°	95,385(2)°	96,244(5)°	90°
<i>U</i>	1402,7(4) Å <sup>3</sup>	1471,3(5) Å <sup>3</sup>	781,32(5) Å <sup>3</sup>	1730,2(4) Å <sup>3</sup>	2302,12(12) Å <sup>3</sup>
<i>Z</i>	1	4	2	2	2
soustava	trojklonná	jednoklonná	trojklonná	trojklonná	jednoklonná
prost. gr.	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>
<i>R</i> <sub>1</sub>	0,0687	0,0307	0,0296	0,0910	0,0382
<i>wR</i> <sub>2</sub>	0,2270	0,0775	0,0800	0,2578	0,0681

## C Seznam zkratk

$\tau_{1/2}$	poločas reakce
CB	Cross Bridged (makrocyklus)
DRIFT	Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform – FTIR měřený difúzní reflexí
EC	Electron Capture – elektronový záchyt
EPR	Enhanced Permeability and Retention – viz část 4.3.2
eV	elektronvolt ( $1,602176 \times 10^{-19}$ J)
FTIR	Fourier Transform Infrared – infračervená spektroskopie s fourierskou transformací
M	mol · dm <sup>-3</sup>
MRI	Magnetic Resonance Imaging – zobrazování magnetickou rezonancí
MS	Mass Spectroscopy – hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární Magnetická Rezonance
SB	Side Bridged (makrocyklus)
$t_{1/2}$	poločas rozpadu
TLC	Thin Layer Chromatography – tenkovrstvá chromatografie
TMS	tetramethylsilan

# Literatura

- [1] P. J. Blower, J. S. Lewis, J. Zweit, *Nuclear Med. & Biology*; 1996; **23**, 957-980.
- [2] J. Havlík, *Diplomová práce*, 2010, Praha.
- [3] H. Elias, *Coord. Chem. Rev.*; **1999**, 37-73.
- [4] M. Boiocchi, M. Bonizzoni, L. Fabbrizzi, F. Foti, M. Licchelli, A. Poggi, A. Taglietti, M. Zema, *Chem. Eur. J.*; 2004, **13**, 3209-3216.
- [5] V. Kubíček, *Ústní sdělení*.
- [6] Wei-Jen Lan, Chung-Sun Chung, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*; **1994**, 191-194.
- [7] L. H. Chen, C. S. Chung, *Inorg. Chem.*; 1988, **27**, 191-194.
- [8] D. N. Pandya, J. Y. Kim, J. C. Park, H. Lee, P. B. Phapale, W. Kwak, T. H. Choi, G. J. Cheon, Y. R. Yoon, J. Yoo, *Chem. Commun.*; 2010, **20**, 3517-3519.
- [9] R.V. Hay, M.M. Hassan, *Polyhedron*; 1997, **13**, 2205-2211.
- [10] P. Lubal, M. Kývala, P. Hermann, J. Holubová, J. Rohovec, J. Havel, I. Lukeš, *Polyhedron*; 2001, **1-2**, 47-55.
- [11] I. Svobodová, *PhD thesis* Brno; **2005**.
- [12] H. Z. Cai, T. A. Kaden, *Helv. Chim. Acta*; 1994, **1**, 383-398.

- [13] K. S. Woodin, K. J. Heroux, C. A. Boswell, E. H. Wong, G. R. Weisman, W. J. Niu, S. A. Tomellini, C. J. Anderson, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold *Eur. J. Inorg. Chem.*; 2005, **23**, 4829-4833.
- [14] J. Kotek, P. Lubal, P. Hermann, I. Císařová, I. Lukeš, T. Godula, I. Svobodová, P. Táborský, J. Havel, *Chem. Eur. J.*; 2003, **1**, 233-248.
- [15] K. J. Heroux, K. S. Woodin, D. J. Tranchemontagne, P. C. B. Widger, E. Southwick, E. H. Wong, G. R. Weisman, S. A. Tomellini, T. J. Wadas, C. J. Anderson, S. Kassel, J. A. Golen, A. L. Rheingold, *Dalton Trans.*; **2007**, 2150-2162.
- [16] D. J. Stigers, R. Ferdani, G. R. Weisman, E. H. Wong, C. J. Anderson, J. A. Golen, C. Moore, A. L. Rheingold, *Dalton Trans.*; 2010, **39**: 1699-1701.
- [17] J. Kotek, *Habilitační práce*; Praha, **2010**.
- [18] M. Kývala, *Program Opium*, dne 15. 5. 2011 dostupné na <<http://web.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html>>.
- [19] Databáze: NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version **7**.
- [20] S. Füzerová, J. Kotek, I. Císařová, P. Hermann, K. Binnemans, I. Lukeš, *Dalton Trans.*; **2005**, 2908-2915.
- [21] J. Plutnar, materiál z konference *COST meeting* v Eindhoven, **2006**.
- [22] J. Plutnar, J. Havlíčková, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukeš, *New J. Chem.*; 2008, **32**, 496-504.
- [23] Ch. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 10827-10852.
- [24] H. So-Yeop, Young-Ah Kim, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 2447-2467.
- [25] Hermanson G. T.: *Bioconjugate Techniques*, 2<sup>nd</sup> Edition, Academic Press **2008**, ISBN: 978-0-12-370501-3 – Heidelberg.

- [26] C. J. Anderson, M. J. Welch, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2219-2234.
- [27] M. F. Giblin, B. Veerendra, Ch. J. Smith, *In Vivo*, 2005, **19**, 9-30.
- [28] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 6387-6392.
- [29] H. Maeda, G. Bharate, J. Darawalla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009, **71**, 409-419.
- [30] T. Minko, S. S. Dharap, R. I. Pakunlu, Y. Wang, *Current Drug Targets*, 2004, **5**, 389-406.
- [31] W. L. F. Armerego, Ch. L. L. Chai, *Purification of Laboratory Chemicals*; 5<sup>th</sup> ed., **2003**, Burlington, ISBN: 0-7506-7571-2.
- [32] M. Paúrová, *Bakalářská práce*, **2010**, Praha.
- [33] T. Williams, C. Kelley, *Gnuplot* version **4.4.2**; dostupný na <http://www.gnuplot.info/>.
- [34] B. Bosnich, C. K. Poon, M. L. Tobe, *Inorg. Chem.*; 1965, **4**, 1102.

**Abstrakt:**

Vzhledem k nesporným farmakologickým výhodám látek značených radio-nuklidy kovů a jejich využití v humánní medicíně je tato práce zaměřena především na design a syntézu nového ligandového systému pro komplexaci dvojmocné mědi. Zvýšená pozornost je pak věnována studiu jeho vlastností ve vodných roztocích a také možnostem jeho navázání na farmakologicky aktivní molekuly.

**Abstrakt:**

Because of an indisputable pharmacological advantages of radiometal-labeled compounds, a purpose of this work it to design and synthesize a new chelation system for copper(II) complexation. The solution properties of the ligand and copper complex are also studied, as well as its ability for binding a targeting molecule.

Projekt byl financován z grantu GAČR číslo *P207/11/1437*.

Tento dokument byl vysázen programem  $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$

<<http://www.latex-project.org>>

Použitá rodina písma: *Computer Modern* (Donald Knuth)

Praha, 2011